

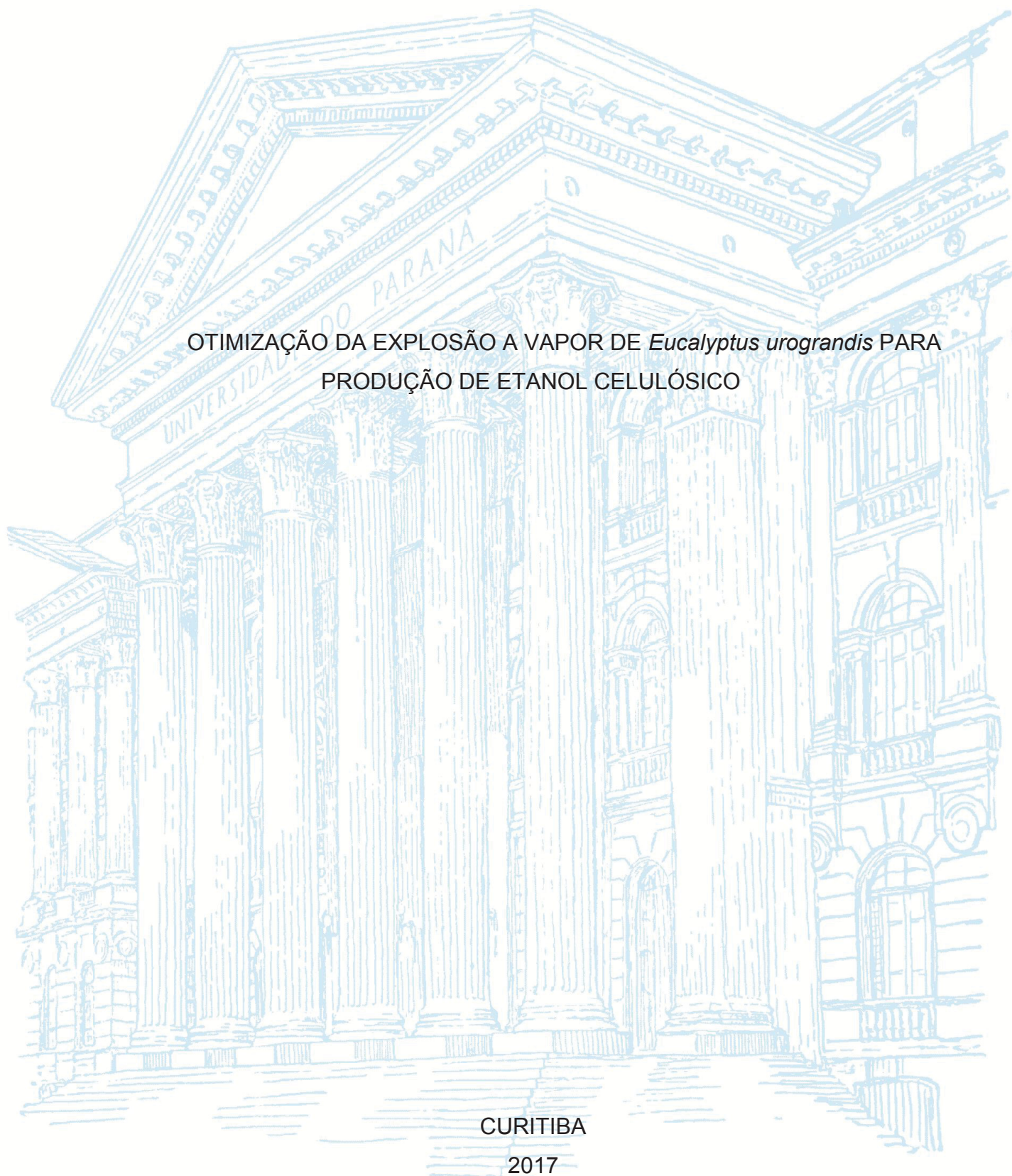
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANA MARCELE CHIARELLO

OTIMIZAÇÃO DA EXPLOSÃO A VAPOR DE *Eucalyptus urograndis* PARA  
PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO

CURITIBA

2017



LUANA MARCELE CHIARELLO

OTIMIZAÇÃO DA EXPLOSÃO A VAPOR DE *Eucalyptus urograndis* PARA  
PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO

Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Doutor em Química, no  
Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de  
Ciências Exatas, da Universidade Federal do  
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

CURITIBA

2017

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR  
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

C532o

Chiarello, Luana Marcelle

Otimização da explosão a vapor de eucalyptus urograndis para produção de etanol celulósico / Luana Marcelle Chiarello. – Curitiba, 2018.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Orientador: Luiz Pereira Ramos. -

1. Etanol – combustível. 2. Etanol celulósico. 3. Explosão a vapor. I. Universidade Federal do Paraná. II. Ramos, Luiz Pereira. Título.

CDD: 547.215

Bibliotecária: Vanusa Maciel - CRB - 9/1928

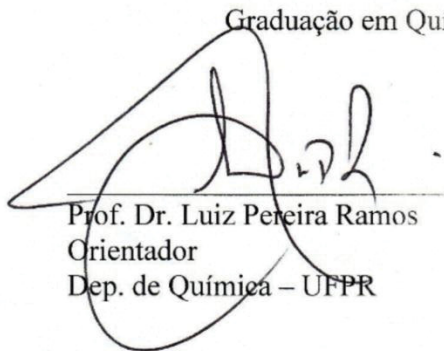
TERMO DE APROVAÇÃO

**OTIMIZAÇÃO DA EXPLOSÃO A VAPOR DE *EUCALYPTUS*  
*UROGRANDIS* PARA PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO**

por

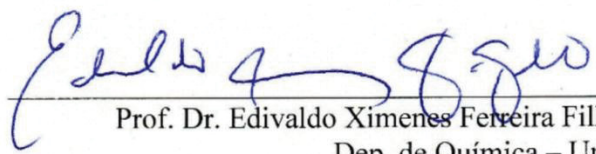
**LUANA MARCELE CHIARELLO**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



---

Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos  
Orientador  
Dep. de Química – UFPR



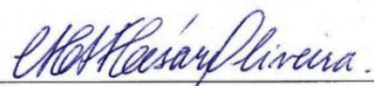
---

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho  
Dep. de Química – UnB




---

Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva  
Dep. de Biotecnologia – EEL/USP



---

Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida Ferreira César-Oliveira  
Dep. de Química – UFPR



---

Prof. Dr. Francisco de Assis Marques  
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 30 de outubro de 2017.



## **AGRADECIMENTOS**

À minha família pelo apoio e incentivo, em especial meus pais Ivo e Maria de Jesus Chiarello, pelo amor, educação e por sempre participarem das minhas conquistas. Obrigada por tudo, amo vocês!

Agradeço ao meu marido Edson Wruck Junior, pelo carinho, cuidados, compreensão e constante incentivo. Seu apoio, companheirismo, cálculos, planilhas e gráficos foram fundamentais, eu te amo muito! Obrigada por me aturar né?

Ao meu orientador Professor Dr. Luiz Pereira Ramos, pela oportunidade, por toda a paciência, orientação, incentivo, dedicação e contribuição em meu crescimento profissional ao longo desses 5 anos. Aprendi muito, continuo aprendendo e nunca vou esquecer o nosso grupo!

À Professora Antje Potthast, pela oportunidade e acolhimento em seu grupo de pesquisa durante meu estágio sanduíche em Viena – Áustria. Assim como à Sara Zaccaron e Sonja Schiehser pelo apoio, conselhos, dicas e toda ajuda em laboratório. Foi muito especial o tempo que passei com vocês!

Ao PPGQ, Professores e ao Departamento de Química, pelo conhecimento compartilhado durante meu tempo na UFPR. Agradecimento especial à Professora Jaísa F. Soares e ao Marcelino Câmara, Emilene A. da Cruz e Fernanda G. D. Pinheiro por sempre estarem dispostos a ajudar e responder minhas dúvidas.

Aos vizinhos e amigos, pois, meio que sem querer formei uma segunda família aqui em Curitiba e gostaria de agradecer por tudo! Agradeço à mão sempre estendida, as caronas super bem-vindas, companhia durante as madrugadas no lab, os incontáveis doces e bolos (ai saudade dos brigadeiros), o ombro amigo, o cuidado quando eu adoecia, as palavras de apoio, aos vários e vários chocolates divididos, aquelas boas risadas e fofocas, conselhos e até pelas broncas. Obrigada a todos, em especial aos meus vizinhos: Guilherme Ferrario, Karen Z. Costa, Karine P. Naidek, Felipe J. Chaulet, Poliana L. Costa, Leociley R. A. Menezes, Alberto C. Botelho, César A. M. Destro e aos amigos queridos: Priscila V. Neves, Emanuelle K. Meneghetti (Manu), Mara C. Dalmolin, Aline S. Muniz, Maria Aparecida F. C. Oliveira (Cida), Angelo R. S. Oliveira, Jacqueline M. F. César. Com certeza sentirei saudades, vocês todos foram indispensáveis, tornaram tudo mais leve e trarei um pouquinho de cada um de vocês para sempre comigo!

Aos colegas atuais e antigos do CEPESQ, em especial Marcos Silveira, Ana Paula Pitarelo, Vinícius Kothe, Bruno Vanelli, William F. da Silva, Alígia Useda, Arion Zandoná Filho, Gustavo R. Gomes, Rafael D. de Lima, Giselli da Silva, Mateus Urio e Douglas H. Fockink, Felipe Sikora, pelo apoio, pela ajuda no lab, pelos mutirões de limpeza, pela companhia nas filas do RU e congressos, pelas confraternizações e pela convivência diária. Agradeço também aos meus filhos de iniciação científica, Carlos Eduardo A. Ramos, Esther M. Lima, Lucelena F. F. dos Santos e Andressa Gonçalves, por toda a ajuda e pela amizade.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro com concessão de bolsas no Brasil e no exterior.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização e conclusão desse trabalho... **MUITO OBRIGADA!**

“An arrow can only be shot by pulling it backward. When life is dragging you back with difficulties, it means it’s going to launch you into something great. So just focus, and keep aiming.”

(Anônimo)

## RESUMO

A utilização de biomassa lignocelulósica é cada vez mais importante para mitigar o consumo de combustíveis fósseis e aumentar o uso energético de fontes renováveis. Nesse sentido, a produção de etanol celulósico tem sido posta em grande evidência. Esse processo de conversão se dá a partir da realização de cinco etapas sequenciais: (1) coleta e preparo da matéria-prima; (2) pré-tratamento; (3) hidrólise enzimática; (4) fermentação alcoólica; e (5) recuperação do etanol por destilação. Nesse estudo, cavacos de *Eucalyptus urograndis* foram explodidos a vapor para avaliar o efeito do pré-tratamento sobre sua composição química e hidrólise enzimática, com vistas à produção de etanol celulósico. Os experimentos foram organizados em um planejamento fatorial cujas condições de temperatura e tempo variaram de 174 a 216 °C e de 4 a 11 min com três repetições no ponto central (195 °C, 7,5 min). Os rendimentos das frações insolúveis em água desses pré-tratamentos, assim como a conversão por hidrólise enzimática (33 mg g<sup>-1</sup> Cellic CTec2 ou CTec3, Novozymes) e o rendimento final de glucose para ambas as enzimas testadas apresentaram correlação linear com a severidade do processo. Além disso, o grau de polimerização da celulose também apresentou relação direta com o fator de severidade. Apesar da condição mais drástica de pré-tratamento resultar no substrato com maior susceptibilidade à hidrólise, a melhor condição dentre as estudadas foi estabelecida em 210 °C, 5 min devido ao seu maior rendimento final em glucose após as etapas de pré-tratamento e hidrólise. Já a análise dos produtos da metanólise ácida das frações resultantes do pré-tratamento indicaram que houve hidrólise e solubilização das pectinas do material para a fração solúvel e, no caso da fração insolúvel, as galactoglucomanas foram mais resistentes ao pré-tratamento do que as arabinoglucuronoxilanas, sendo que parte das ramnagalacturonanas (pectinas) ainda resistiu a essas condições. Além disso, o melhor material explodido a vapor foi deslignificado com 0,1 e 0,5 g de NaOH g<sup>-1</sup> de substrato seco por 30 min a 80 °C, em procedimentos assistidos ou não por ultrassom. O emprego da menor concentração de NaOH apresentou baixos valores de deslignificação e não houve diferença estatisticamente significativa ao se empregar o ultrassom. Nas extrações com 0,5 g de NaOH g<sup>-1</sup> de substrato, níveis de deslignificação acima de 94 % foram obtidos a partir do material explodido a vapor. Finalmente, ensaios de hidrólise enzimática foram realizados empregando 20% de sólidos totais e o perfil obtido para substratos derivados de eucalipto foram comparados ao desempenho na hidrólise de bagaço de cana explodido a vapor. Essas reações atingiram 124 e 102 g L<sup>-1</sup> de glucose em 72 h, respectivamente, e os hidrolisados foram facilmente convertidos em etanol com 1 g L<sup>-1</sup> de levedura Thermosacc Dry (Lallemand), atingindo valores acima de 25 g L<sup>-1</sup> de etanol e produtividades superiores a 2,1 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em 12 h de fermentação. Ao realizar uma projeção dos resultados de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação, concluiu-se que os cavacos de eucalipto apresentaram maior potencial para produção de etanol celulósico do que o bagaço de cana.

**Palavras-chave:** *Eucalyptus urograndis*; explosão a vapor; etanol celulósico.



## ABSTRACT

The use of lignocellulosic biomass is increasingly important in order to mitigate the consumption of fossil fuels and increase the energy use of renewable sources. In this sense, the production of cellulosic ethanol has been put in great evidence. This process conversion takes place through the accomplishment of five sequential stages: (1) collection and preparation of the raw material; (2) pretreatment; (3) enzymatic hydrolysis; (4) alcoholic fermentation; and (5) recovering ethanol by distillation. In this study, *Eucalyptus urograndis* wood chips were steam-exploded to assess the effect of pretreatment on their chemical composition and enzymatic hydrolysis, aiming to the production of cellulosic ethanol. The experiments were organized in a factorial design whose conditions ranged from 174 to 216 °C and from 4 to 11 min with three replicates at the center point (195 °C, 7.5 min). The yields of the water-insoluble fractions of these pre-treatments, as well as the conversion by enzymatic hydrolysis (33 mg g<sup>-1</sup> Cellic CTec2 or CTec3, Novozymes) and the final glucose yield for both enzymes tested, showed a linear correlation with the severity of process. In addition, the degree of polymerization of cellulose was also directly related to the severity factor. Although most severe pretreatment condition resulted in the substrate with the highest susceptibility to hydrolysis, the best condition was set at 210 °C, 5 min due to its higher final yield in glucose after the pretreatment and hydrolysis steps. The analysis of acidic methanolysis products of the fractions resulting from pretreatment indicated that there was hydrolysis and solubilization of the pectins of the material to the soluble fraction and, in the case of the insoluble fraction, the galactoglucomannans were more resistant to pretreatment than the arabinoglucuronoxylans, and some of the ramnogalacturonans (pectins) still withstood these conditions. In addition, the best steam exploded material was delignified with 0.1 and 0.5 g NaOH g<sup>-1</sup> per dried substrate during 30 min at 80 °C in procedures assisted or not by ultrasound. The use of the lowest concentration of NaOH had low delignification values and there was no statistically significant difference when using the ultrasound. In the extractions with 0.5 g NaOH g<sup>-1</sup> substrate, delignification levels above 94% were obtained from the steam exploded material. Finally, enzymatic hydrolysis assays were carried using 20% of total solids and the profile obtained for eucalyptus-derived substrates were compared to the hydrolysis performance of steam exploded sugarcane bagasse. These reactions reached 124 and 102 g L<sup>-1</sup> glucose in 72 h, respectively, and the hydrolysates were easily converted to ethanol with 1 g L<sup>-1</sup> of yeast Thermosac Dry (Lallemand), reaching values above 25 g L<sup>-1</sup> ethanol and yields greater than 2.1 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in 12 h of fermentation. When a projection of the results of pre-treatment, enzymatic hydrolysis and fermentation was carried out, it was concluded that the eucalyptus wood chips had a higher potential for the production of cellulosic ethanol than the sugarcane bagasse.

**Key-words:** *Eucalyptus urograndis*; steam explosion; cellulosic ethanol.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Fluxograma da produção de etanol celulósico, mostrando as possibilidades de integração entre diferentes processos (SSF, <i>simultaneous saccharification and fermentation</i> ; CF, <i>co-fermentation</i> ; SSCF, <i>simultaneous saccharification and co-fermentation</i> ; CBP, <i>consolidated bioprocessing</i> ) (Pitarelo et al., 2012b). .....                                 | 22 |
| <b>Figura 2.</b> Plataforma dos carboidratos e da lignina para suprir a obtenção de insumos químicos a partir da biomassa lignocelulósica (Ramos et al., 2017). .....   | 24 |
| <b>Figura 3.</b> Estrutura molecular da celulose indicando os números dos átomos de carbono e os terminais redutor (extremidade direita na cor vermelha) e não-redutor (extremidade esquerda na cor verde) (Adaptado de Wertz et al 2010). .....  | 26 |
| <b>Figura 4.</b> Estrutura da (A) celobiose e (B) celulose, mostrando o arranjo de ligações de hidrogênio intermoleculares (em vermelho) e intramoleculares (em azul) entre as cadeias lineares (Silveira et al., 2014). .....  | 27 |
| <b>Figura 5.</b> Estrutura dos monossacarídeos presentes em hemiceluloses e pectinas, divididos em: pentoses como (A1) D-xilose, (A2) L-arabinose; deoxi-hexoses como (B1) L-ramnose; hexoses como (C1) D-glucose, (C2) D-galactose e (C3) D-manose; ácidos urônicos como (D1) ácido D-glucurônico, (D2) ácido D-galacturônico e (D3) ácido 4-O-metil-D-glucurônico. ....                               | 28 |
| <b>Figura 6.</b> Representações esquemáticas de cadeias de (A) arabinoglucuronoxilanas e (B) galactoglucomananas (Adaptado de Gomes, 2016). ....  | 29 |
| <b>Figura 7.</b> Estrutura (A) dos álcoois precursores da lignina com unidades G, H e S, e (B) principais ligações presentes na lignina (Adaptado de Ramos et al., 2016 e Santos, 2001). .....  | 31 |
| <b>Figura 8.</b> Representação do complexo lignina-carboidrato de bagaço de cana, mostrando agregados de celulose com fragmentos de xiloglucanas e arabinoferuloil-xilanas ligados covalentemente a um fragmento de lignina (em azul) (Silveira et al., 2014). ....   | 33 |
| <b>Figura 9.</b> Compostos formados durante a explosão a vapor a partir da celulose e das hemiceluloses (4-O-metilglucuronoxilana): (1) arabinose, (2) xilose, (3) xilooligômeros acetilados (GP 3), (4) xilooligômeros de alta massa molecular, (5) oligossacarídeos ácidos ramificados, (6) glucose, (7) celobiose, (8) celo-oligômeros, (9) ácido acético, (10) hidroximetilfurfural, (11) furfural, |    |

|  |    |
|--|----|
| (12) ácido levulínico, (13) ácido fórmico, (14) furano e (15) ácido 2-furóico (Adaptado de Ramos, 2003).   | 39 |
| <b>Figura 10.</b> Proposta mecanística da quebra das ligações $\beta$ -O-4 (Adaptado de Ramos et al., 2017).   | 41 |
| <b>Figura 11.</b> Sinergismo entre o complexo celulolítico durante a hidrólise enzimática da celulose (Silveira et al., 2014).   | 43 |
| <b>Figura 12.</b> Representação dos mecanismos para clivagem das ligações $\beta$ -(1-4) com (A) inversão e (B) retenção de configuração (Melo e Carvalho, 2006).  | 44 |
| <b>Figura 13.</b> Síntese de etanol a partir do piruvato empregando a enzima álcool desidrogenase (Adaptado de Eran e Ma, 2013).   | 47 |
| <b>Figura 14.</b> Estratégia de ação empregada para o desenvolvimento deste trabalho (PT = pré-tratamento; US = ultrassom).  | 50 |
| <b>Figura 15.</b> Imagens do (A) reator de explosão a vapor e da (B) válvulas de esfera localizada na sua parte superior que se encontram instaladas no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) da UFPR.   | 56 |
| <b>Figura 16.</b> Representação gráfica do planejamento fatorial (PF) $2^2$ com projeção em axial, indicando as condições de tempo e temperatura definidas no delineamento.  | 57 |
| <b>Figura 17.</b> Fluxograma da metodologia empregada para os pré-tratamentos de cavacos de eucalipto com suas respectivas abreviações.  | 59 |
| <b>Figura 18.</b> Reator Infors-HT Labfors 5 BioEtOH (A), com capacidade total de 3,6 L, e (B) sistema de agitação múltipla, composta por vários impelidores sequenciais: uma hélice naval com <i>downflow</i> , quebradores de viscosidade, um impelidor helicoidal e, por último, um impelidor de fundo. | 60 |
| <b>Figura 19.</b> Recuperação de sólidos totais das frações (A) insolúvel e (B) solúvel em água derivadas da explosão a vapor de <i>E. urograndis</i> sob diferentes condições de auto-hidrólise (EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura).                         | 64 |
| <b>Figura 20.</b> Relação entre o fator de severidade ( $\log R_0$ ) e rendimento da fração insolúvel (%) obtida na explosão a vapor de <i>E. urograndis</i> (marcador sem preenchimento = vértices do cubo, preenchidos = pontos axiais e x = ponto central do delineamento fatorial).                    | 65 |
| <b>Figura 21.</b> Perfil cromatográfico após análise por HPLC das frações solúveis obtidas após o pré-tratamento (auto-hidrólise) de cavacos de <i>E. urograndis</i> sob diferentes  |    |

|   |    |
|---|----|
| condições de explosões a vapor, sendo (A) parte dos carboidratos e (B) compostos furânicos (PC = ponto central; EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura).....  | 66 |
| <b>Figura 22.</b> HPTLC com 2 µL das amostras: PC, EAH4, EAH5, EAH6, EAH7, EAH8, EAH9, EAH10, EAH11 e BAH; 3 µL dos padrões de xilose e xilooligômeros com diferentes graus de polimerização (GP3 - xilotriose, GP4 - xilotetraose, GP5 - xilopentaose e GP6 - xilohexaose) e 1µL de celooligômeros iniciando com glucose até GP10 (PC = ponto central; EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura). .... | 70 |
| <b>Figura 23.</b> Distribuição em massas molares dos substratos deslignificados que foram preparados a partir de <i>E. urograndis</i> explodido a vapor. (A) Vértices e (B) pontos axiais do delineamento fatorial 2 <sup>2</sup> em relação ao seu ponto central (PC = ponto central; EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura).....   | 75 |
| <b>Figura 24.</b> Relação entre o fator de severidade (log R <sub>O</sub> ) e o grau de polimerização (GP <sub>M</sub> ) dos substratos deslignificados derivados de <i>E. urograndis</i> por explosão a vapor. ....  | 77 |
| <b>Figura 25.</b> Hidrólise enzimática do <i>E. urograndis</i> em equivalentes de glucose (%) em relação ao tempo de reação, empregando (A) Cellic CTec2 e (B) Cellic CTec3 (marcador sem preenchimento = vértices do cubo, preenchidos = pontos axiais e x = ponto central do delineamento fatorial, PC = ponto central; EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura). ....                               | 78 |
| <b>Figura 26.</b> Relação entre fator de severidade (log R <sub>O</sub> ) e os equivalentes de glucose (%) obtidos na hidrólise enzimática de cavacos de <i>E. urograndis</i> pré-tratado a vapor empregando (A) Cellic CTec2 e (B) Cellic CTec3 (marcador sem preenchimento = vértices do cubo, preenchidos = pontos axiais e x = ponto central do delineamento fatorial).....   | 79 |
| <b>Figura 27.</b> Gráfico de Pareto para EqGlc (%) obtidos partir da hidrólise enzimática com (A) Cellic CTec2 e (B) empregando Cellic CTec3. ....  | 81 |
| <b>Figura 28.</b> Superfícies de resposta que descrevem a variação dos EqGlc (%) obtidos partir da hidrólise enzimática com (A) Cellic CTec2 e (B) Cellic CTec3.....  | 82 |
| <b>Figura 29.</b> Relação entre fator de severidade (log R <sub>O</sub> ) e os rendimentos finais de glucose (%) obtidos após pré-tratamento e hidrólise enzimática de <i>E. urograndis</i> pré-tratado a vapor, empregando (A) Cellic CTec2 e (B) Cellic CTec3 (marcador sem   |    |

|   |    |
|---|----|
| preenchimento = vértices do cubo, preenchidos = pontos axiais e x = ponto central do delineamento fatorial).  | 84 |
| <b>Figura 30.</b> Perfil de hidrólise enzimática dos substratos derivados do pré-tratamento de cavacos de eucalipto por explosão a vapor (EAH6), pelo processo combinado de explosão a vapor seguido de extração alcalina (EAH6/EA) e somente extraído com álcali (E/EA), obtidos na ausência e presença de ultrassom (US) (0,5 = quantidade (em g) de NaOH g <sup>-1</sup> substrato seco empregado na deslignificação alcalina).                          | 88 |
| <b>Figura 31.</b> Perfis de hidrólise enzimática de eucalipto explodido a vapor (EAH6) e explodido a vapor seguido de extração alcalina (EAH6/EA) empregando 33 mg de Cellic CTec3 g <sup>-1</sup> celulose, (A) mantendo sólidos totais fixo com variação da carga enzimática e (B) com a mesma carga enzimática variando o teor de sólidos totais (0,5 = quantidade (em g) de NaOH g <sup>-1</sup> substrato seco empregado na deslignificação alcalina). | 89 |
| <b>Figura 32.</b> Valores de conversão de equivalentes glucose (%) em diferentes tempos para a hidrólise enzimática das condições do planejamento fatorial do <i>E. urograndis</i> após extração (marcador sem preenchimento = vértices do cubo, preenchidos = pontos axiais e x = ponto central do delineamento fatorial, PC = ponto central; EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura).                             | 93 |
| <b>Figura 33.</b> Comparação da composição química de amostras <i>in natura</i> de cavacos de <i>E. urograndis</i> e bagaço de cana-de-açúcar.  | 94 |
| <b>Figura 34.</b> Conversão em equivalentes de glucose (g L <sup>-1</sup> ) durante a hidrólise enzimática de substratos pré-tratados a vapor empregando Cellic CTec3.  | 95 |
| <b>Figura 35.</b> Gráficos de consumo de glucose (g L <sup>-1</sup> ) e produção de etanol (g L <sup>-1</sup> ) a partir dos hidrolisados enzimáticos utilizando (A) Thermosacc Dry e (B) CAT-1.  | 97 |
| <b>Figura 36.</b> Consumo de glucose (g L <sup>-1</sup> ) e produção de etanol (g L <sup>-1</sup> ) a partir dos hidrolisados enzimáticos utilizando a levedura Thermosacc Dry.   | 98 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Principais técnicas de pré-tratamento que já foram aplicadas a materiais lignocelulósicos (Ogeda e Petri, 2010; Neves, 2014; Gomes, 2016). .....   | 35 |
| <b>Tabela 2.</b> Enzimas envolvidas e produtos gerados na glicólise. ....   | 46 |
| <b>Tabela 3.</b> Caracterização química dos substratos celulósicos com suas respectivas normas. ....  | 50 |
| <b>Tabela 4.</b> Condições empregadas no pré-tratamento por explosão a vapor de <i>E. urograndis</i> e seus respectivos fatores de severidade ( $\log R_O$ ). ....  | 57 |
| <b>Tabela 5.</b> Metanólise das frações solúveis derivadas de <i>E. urograndis</i> pré-tratado por explosão a vapor, expressos em relação à massa seca de material e ajustados ao seu teor de sólidos totais. ....  | 68 |
| <b>Tabela 6.</b> Composição química material <i>in natura</i> e dos substratos produzidos a partir do pré-tratamento por explosão a vapor em diferentes condições. ....   | 71 |
| <b>Tabela 7.</b> Metanólise das frações insolúveis derivadas de <i>E. urograndis</i> pré-tratado por explosão a vapor, considerando o seu rendimento mássico e expressando os valores obtidos em relação à massa seca do material <i>in natura</i> . .... | 73 |
| <b>Tabela 8.</b> Massas molares, polidispersidade e grau de polimerização dos polissacarídeos (holocelulose) presentes em substratos deslignificados derivados de <i>E. urograndis</i> por explosão a vapor. ....   | 76 |
| <b>Tabela 9.</b> Análise de variância dos equivalentes de glucose produzido em 96 h para Cellic CTec2 e Cellic CTec3. ....  | 80 |
| <b>Tabela 10.</b> Rendimentos da fração insolúvel ( $R_{FI}$ ), equivalentes de glucose após 96h de hidrólise enzimática e rendimento final de glucose ( $RF_{Glc}$ ) para o eucalipto. ....  | 83 |
| <b>Tabela 11.</b> Rendimento mássico, recuperação de glucana e deslignificação dos substratos pré-tratados. ....  | 85 |
| <b>Tabela 12.</b> Composição química dos substratos produzidos a partir do eucalipto. ....  | 86 |
| <b>Tabela 13.</b> Metanólise dos eucaliptos pré-tratados a vapor e deslignificação alcalina em $g\ g^{-1}$ massa seca. ....   | 88 |
| <b>Tabela 14.</b> Rendimento mássico, recuperação de celulose e deslignificação dos substratos de eucalipto produzidos a partir das condições do planejamento fatorial. ....  | 90 |



|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 15.</b> Composição química de substratos deslignificados derivados de <i>E. urograndis</i> nativo e explodido a vapor nas condições do planejamento fatorial após de extração alcalina com e sem auxílio do ultrassom. .... | 91  |
| <b>Tabela 16.</b> Metanólise em g g <sup>-1</sup> massa seca das condições do planejamento fatorial do <i>E. urograndis</i> após extração com e sem auxílio do ultrassom. ....  | 92  |
| <b>Tabela 17.</b> Projeção da produção de etanol celulósico por tonelada de biomassa processada.....  | 100 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA9** – atividade auxiliar da família 9 (do inglês *auxiliary activities*)
- ADP** – difosfato de adenosina
- AFEX** – amônia líquida (do inglês *ammonia fibre expansion*)
- AH** – explosão a vapor na condição auto-hidrólise
- AnGlc** – anidrogucose
- ANOVA** – análise de variância
- AnXyl** – anidroxilose
- Asn** – aspargina
- ATP** – trifosfato de adenosina
- BAH** – bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor - auto-hidrólise
- CBH** – celobiohidrolases
- CBP** – bioprocesso consolidado (do inglês *consolidated bioprocessing*)
- CEPESQ** – Centro de Pesquisa em Química Aplicada
- CF** – co-fermentação (do inglês *co-fermentation*)
- GP** – grau de polimerização
- E** – eucalipto
- EA** – extração alcalina
- EAH** – eucalipto explodido a vapor por processo de auto-hidrólise
- EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EnG** – endoglucanase
- EqGlc** – equivalente de glucose
- ExG** – exoglucanase
- FID** – detector de ionização em chama
- GH61** – glicosil-hidrolase família 61 (do inglês *glycosyl-hydrolase family 61*)
- Gln** – glutamina
- GPC** – cromatografia de permeação em gel (do inglês *gel permeation chromatography*)
- HPLC** – cromatografia a líquido de alta eficiência (do inglês *high performance liquid chromatography*)
- HPTLC** – cromatografia em camada delgada de alta eficiência (do inglês *high performance thin layer chromatography*)

**LPMO** – monooxigenases líticas de polissacarídeos (do inglês *oxidative lytic polysaccharide monooxygenases*)

**MALLS** – espalhamento de luz de multi-ângulo (do inglês *multiangle laser light scattering*)

**MMn** – massa molar numérica média

**MMw** – massa molar ponderal média

**NAD** – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

**NREL** – National Renewable Energy Laboratory

**PC** – ponto central

**pSSF** – pré-sacarificação antes da sacarificação e fermentação simultânea (do inglês *pre-saccharification prior to simultaneous saccharification and fermentation*)

**R<sub>f</sub>** – índice de retenção

**RID** – índice de refração

**SHF** – hidrólise e fermentação em separado (do inglês *separate hydrolysis and fermentation*)

**SSCF** – sacarificação e co-fermentação simultâneas (do inglês *simultaneous saccharification and co-fermentation*)

**SSF** – sacarificação e fermentação simultânea (do inglês *simultaneous saccharification and fermentation*)

**Tyr** – tirosina

**UNICA** – União da Indústria de Cana-de-Açúcar

**US** – ultrassom

**UV-DAD** – espectrometria no ultravioleta com rede de fotodiodos

## SUMÁRIO

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>20</b> |
| <b>2</b>     | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>25</b> |
| 2.1          | MATÉRIA-PRIMA .....  | 25        |
| 2.2          | PRÉ-TRATAMENTO .....   | 34        |
| 2.3          | HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....  | 41        |
| 2.4          | FERMENTAÇÃO .....  | 45        |
| <b>3</b>     | <b>OBJETIVOS .....</b>   | <b>48</b> |
| 3.1          | OBJETIVO GERAL.....  | 48        |
| 3.2          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 48        |
| <b>4</b>     | <b>METODOLOGIA .....</b>   | <b>49</b> |
| 4.1          | MATERIAIS .....  | 49        |
| 4.2          | MÉTODOS .....  | 49        |
| <b>4.2.1</b> | <b>Análise química dos materiais celulósicos.....</b>  | <b>49</b> |
| 4.2.1.1      | Determinação teor de extraíveis.....   | 50        |
| 4.2.1.2      | Determinação de massa seca e cinzas .....  | 51        |
| 4.2.1.3      | Determinação de carboidratos e lignina .....   | 51        |
| 4.2.1.4      | Análise dos oligômeros da fração solúvel .....   | 52        |
| 4.2.1.5      | Determinação dos carboidratos por metanólise ácida.....  | 53        |
| 4.2.1.6      | Determinação de massas molares, polidispersidade e grau de<br>polimerização dos substratos pré-tratados..... | 54        |
| <b>4.2.2</b> | <b>Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos .....</b>  | <b>55</b> |
| 4.2.2.1      | Pré-tratamento por explosão a vapor (auto-hidrólise) .....   | 55        |
| 4.2.2.2      | Pré-tratamento por deslignificação alcalina .....  | 58        |
| <b>4.2.3</b> | <b>Hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados .....</b>  | <b>58</b> |
| 4.2.3.1      | Hidrólise enzimática com baixo teor de sólidos totais .....  | 58        |
| 4.2.3.2      | Hidrólise enzimática com alto teor de sólidos totais .....   | 60        |
| <b>4.2.4</b> | <b>Ensaio de fermentação .....</b>   | <b>61</b> |
| <b>4.2.5</b> | <b>Tratamento estatístico .....</b>  | <b>62</b> |

|          |   |                                      |
|----------|---|--------------------------------------|
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 5.1      | PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE <i>Eucalyptus urograndis</i> ..... | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 5.1.1    | Pré-tratamento por explosão a vapor .....                                   | Erro! Indicador não definido.        |
| 5.1.2    | Deslignificação alcalina .....  | <b>84</b>                            |
| 5.2      | HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM ALTO TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS .....                   | 92                                   |
| 5.3      | PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO COM DIFERENTES LEVEDURAS.....                 | 96                                   |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO .....</b>  | <b>101</b>                           |
|          | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                     | <b>103</b>                           |

## 1 INTRODUÇÃO

O petróleo é a base da economia produtiva mundial, entretanto, a instabilidade geopolítica nas principais regiões produtoras e a consequente instabilidade no mercado internacional, aliada às alterações climáticas derivadas do acúmulo dos gases de efeito estufa e ao aumento da demanda energética mundial, têm intensificado a procura por fontes alternativas de energia. Estas novas fontes devem ser preferencialmente renováveis e sustentáveis do ponto de vista social, econômico e ambiental (Balat, 2011). De acordo com Carvalho et al. (2015), a demanda por petróleo aumentará cerca de 26 % até 2040 e parte desta deverá ser suprida por fontes renováveis. No ano de 2016, 43,5 % da energia consumida no Brasil foi proveniente de fontes renováveis, sendo etanol e bagaço responsáveis por 40 % desta produção (Ministério de Minas e Energia, Resenha Energética Brasileira – Exercício de 2016, 2017).

O etanol é um dos produtos biotecnológicos mais importantes da economia brasileira e mundial, no que se refere ao balanço entre os quesitos de valor, desempenho, disponibilidade e sustentabilidade (Oliveira et al., 2014). Neste sentido, a produção de etanol de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* - modelo brasileiro) apresenta um aproveitamento energético mais eficiente do que o dependente do amido de milho (modelo norte-americano), conseguindo assim gerar mais equivalentes de energia renovável para cada equivalente de energia fóssil gasto no processo. Em 2016, Brasil e Estados Unidos foram os principais produtores mundiais de etanol, com uma produção cerca de 27,6 e 58,0 bilhões de litros, respectivamente, de acordo com *Renewable Fuels Association* (RFA, 2016).

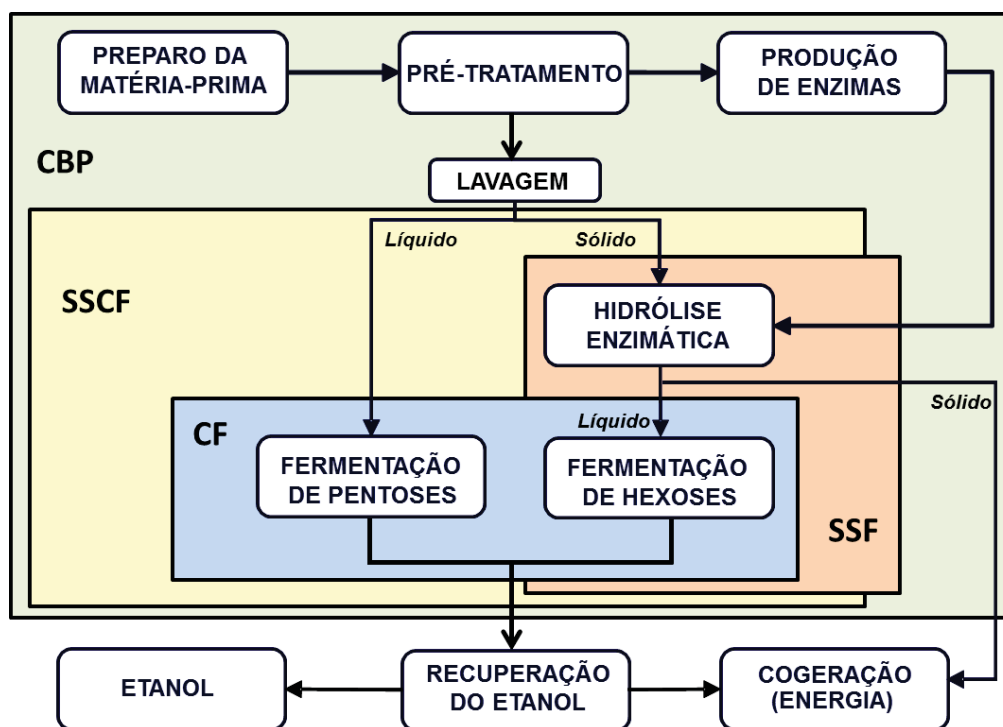
Para mitigar o consumo de combustíveis fósseis e aumentar o uso de fontes renováveis, a utilização de biomassa lignocelulósica se torna uma alternativa cada vez mais importante (Sun et al., 2013). Estes materiais são compostos por três componentes majoritários: a celulose, as hemiceluloses e a lignina. Portanto, a produção de açúcares passíveis de fermentação a partir de lignocelulósicos depende da hidrólise dos polissacarídeos (celulose e hemiceluloses) presentes no material, que pode ser feita por via ácida ou enzimática (Bastos, 2007; Cardona et al., 2010). Tais matérias-primas podem ser agrupadas em categorias específicas, como resíduos agrícolas (Pitarelo, 2012; Lin et al., 2013), culturas energéticas (Mazarei et al., 2011), resíduos florestais (Gonzalez et al., 2011) e lixo orgânico



municipal (Wang et al., 2008). Assim, por definição, o etanol celulósico, também dito de segunda geração, é produzido pela fermentação dos carboidratos liberados pela hidrólise dos polissacarídeos presentes na biomassa vegetal (Geddes et al., 2010; Chiaramonti et al., 2012). Em geral, a conversão de materiais lignocelulósicos em etanol apresenta cinco etapas principais, coleta e preparo da matéria-prima, pré-tratamento, hidrólise, fermentação e recuperação de etanol, e cada um destes estágios ainda apresenta desafios tanto técnicos quanto econômicos (Bensah et al., 2015). Estes desafios se concentram (a) no estabelecimento de uma logística adequada à diversificação, transporte e armazenamento de matéria-prima, (b) no rompimento da estrutura recalcitrante da lignocelulose via pré-tratamento, (c) no custo das enzimas aplicadas no processo de hidrólise enzimática, (d) na limitação dos microrganismos em fermentar simultaneamente pentoses e hexoses provenientes das frações celulósica (C6) e hemicelulósica (C5), respectivamente, e (e) no escalonamento e adequação da infraestrutura para otimização e intensificação do processo. Conforme apresentado na **Figura 1**, tais etapas podem ser realizadas em unidades independentes ou integradas, sendo que a integração destas visa reduzir o seu custo operacional.

Entre os processos até hoje investigados, dois têm se destacado: a hidrólise e fermentação em separado (SHF - do inglês *separate hydrolysis and fermentation*) e a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF - do inglês *simultaneous saccharification and fermentation*). O processo SSF apresenta vantagens sobre o SHF por (a) permitir a redução de uma operação unitária, apresentando assim um menor custo, (b) gerar maiores produtividades de etanol, (c) diminuir a inibição das celulasas pelo acúmulo de carboidratos hidrossolúveis no meio e (d) exigir menores tempos de reação. Entretanto, as enzimas não são empregadas em suas condições de desempenho ótimo, o que pode causar uma diminuição na eficiência do processo (Souza et al., 2012, Santos et al., 2010; Neves et al., 2016). Quando as fermentações de pentoses e hexoses (oriundas das frações hemicelulásicas e celulásicas) ocorrem no mesmo vaso reacional, este processo recebe o nome de co-fermentação (CF - do inglês *co-fermentation*). Assim a sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF - do inglês *simultaneous saccharification and cofermentation*) se dá quando um ou mais organismos capazes de realizar CF é(são) empregado(s) em uma configuração SSF. Finalmente, o bioprocesso consolidado (CBP - do inglês *consolidated bioprocessing*) seria a união de todas as

etapas citadas anteriormente, onde a produção de etanol de segunda geração ocorreria idealmente em um único reator, onde o(s) organismo(s) fermentativo(s) seria(m) também responsável(is) pela etapa de produção de enzimas (Devarapalli e Atiyeh, 2015).



**Figura 1.** Fluxograma da produção de etanol celulósico, mostrando as possibilidades de integração entre diferentes processos (SSF, *simultaneous saccharification and fermentation*; CF, *co-fermentation*; SSCF, *simultaneous saccharification and co-fermentation*; CBP, *consolidated bioprocessing*) (Pitarelo et al., 2012b).

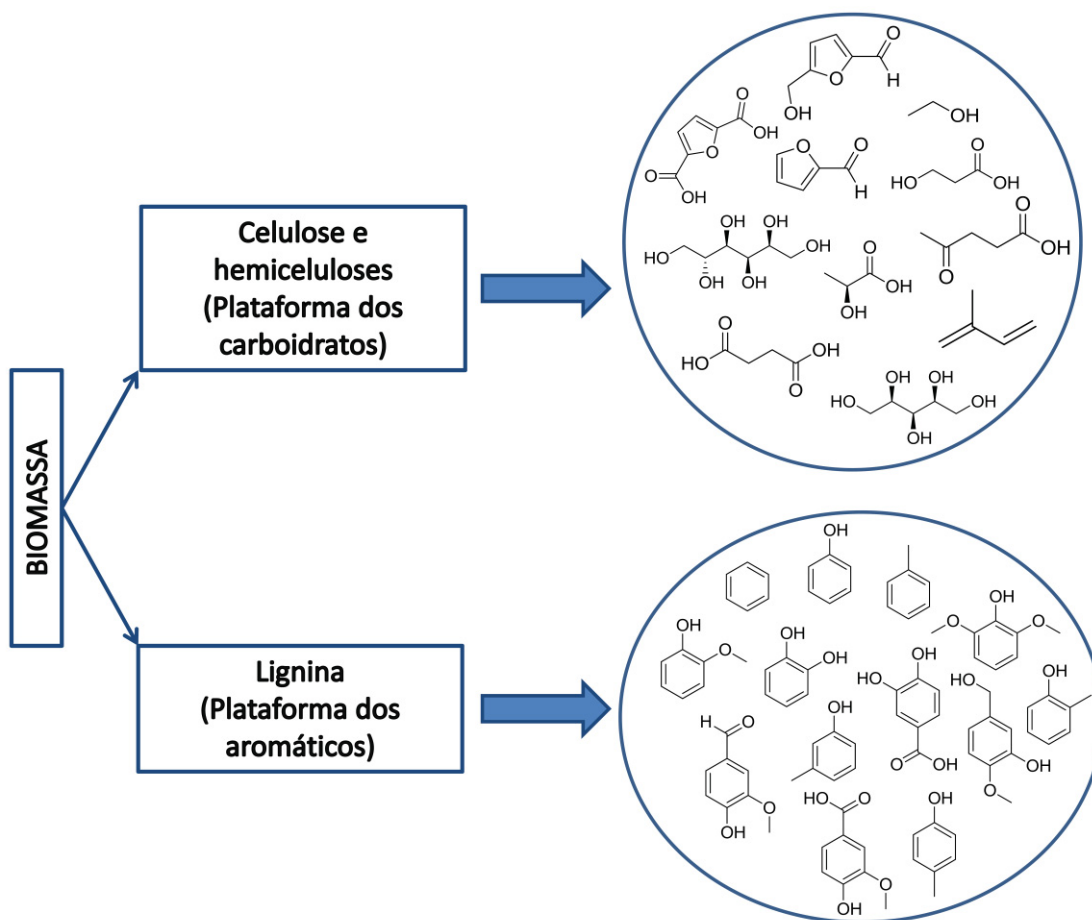
Além desses processos, pode ainda ser realizada uma pré-sacarificação enzimática do material pré-tratado antes da realização de um SSF, caracterizando o processo pSSF (do inglês *pre-saccharification prior to simultaneous saccharification and fermentation*). Entre as vantagens desse processo estão a hidrólise parcial dos polissacarídeos antes da adição da levedura, gerando com isso um aumento na taxa de produção inicial de etanol, já que a levedura dispõe de alguma fonte de carbono desde o início da fermentação (Lin e Tanaka, 2006), com efeitos benéficos sobre a viscosidade da suspensão quando utilizadas altas cargas de sólidos totais (Silva, 2015). De acordo com Santos et al. (2010), ao empregar pSSF, a conversão

enzimática em 16 h foi muito próxima àquela obtida em período semelhante no processo em SHF.

O Brasil já conta com usinas piloto de produção de etanol celulósico a partir de coprodutos da cana-de-açúcar como a palha e o bagaço. A primeira usina brasileira foi instalada em Alagoas em 2014 pela GranBio, com uma capacidade de produção de 82 milhões de litros de etanol. Já a Raízen, formada pela parceria entre a Cosan e a Shell, produz cerca de 40 milhões de litros de etanol a mais por ano além do etanol de primeira geração. Os planos da Raízen incluem a construção de mais sete plantas de etanol celulósico até 2024, enquanto que a Usina São Manoel, alocada em São Manoel (SP) com tecnologia desenvolvida pelo Centro de Tecnologia Canavieira (Piracicaba – SP), tem capacidade para processar 100 toneladas de cana-de-açúcar por dia.

Já no cenário mundial, três empresas inauguraram unidades de etanol celulósico também em 2014: a usina piloto da Dupont, localizada em Nevada (Iowa) com capacidade de produção de 113 milhões de litros de etanol por ano, e as usinas da Abengoa (Hugoton, Kansas) e Poet-DSM (Emmetsburg, Iowa), cujas produções são estimadas em cerca de 95 milhões de litros de etanol por ano cada.

Finalmente, o desenvolvimento das biorrefinarias prevê que vários insumos químicos poderão ser produzidos a partir dos principais componentes presentes na biomassa. A **Figura 2** ilustra um resumo das possibilidades envolvidas nas grandes plataformas de carboidratos e de compostos fenólicos oriundos da lignina. No primeiro caso, a celulose e as hemiceluloses podem ser convertidas em compostos como etanol, furfural, 5-hidroximetil-2-furfural (HMF), ácido 2,5-furanodicarboxílico, glicerol, isopreno, ácido láctico, ácido succínico, ácido levulínico, ácido 3-hidroxipropiônico, sorbitol e xilitol (Bozell e Petersen, 2010). Já no caso da lignina, vários produtos têm sido propostos, como benzeno, fenol, tolueno, 2,6-dimetoxifenol, pirocatecol, 2-metoxifenol, *m*-cresol, *p*-cresol, *o*-cresol, ácido 3,4-di-hidroxibenzoico, e ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico, entre outros (Ramos et al., 2017).



**Figura 2.** Plataforma dos carboidratos e da lignina para suprir a obtenção de insumos químicos a partir da biomassa lignocelulósica (Ramos et al., 2017).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

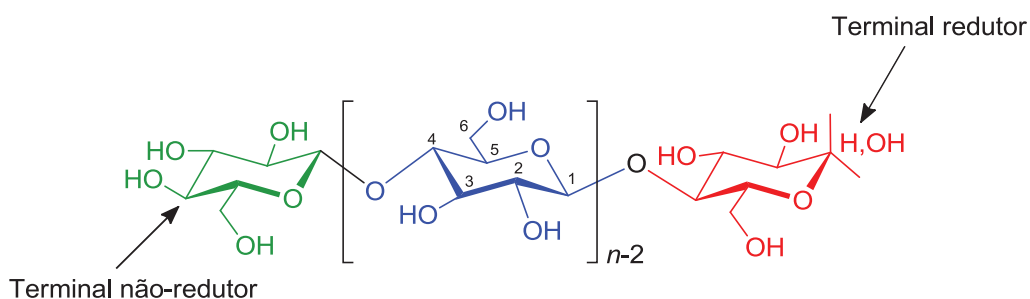
### 2.1 MATÉRIA-PRIMA

Segundo a CONAB (2017a), a safra de 2016/2017 de cana-de-açúcar atingiu 657,2 milhões de toneladas no país utilizando 9,05 milhões de hectares de terra, enquanto que a projeção feita em agosto deste ano para a safra de 2017/2018 foi de 646,4 milhões de toneladas e a área a ser colhida foi estimada em 8,77 milhões de hectares (CONAB, 2017b). Como a cana depois de processada gera aproximadamente 14 % de bagaço seco, é então esperada a produção de 90,5 milhões de toneladas deste resíduo. Portanto, o bagaço, ainda que esteja sendo utilizado para fins energéticos, representa uma ótima oportunidade para a produção de etanol celulósico e para o desenvolvimento de projetos de biorrefinaria.

Por outro lado, o Brasil é o maior produtor mundial de celulose a partir de fibras curtas de *Eucalyptus* spp. (Bragatto, 2010), sendo que *Eucalyptus grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla* são as espécies mais cultivadas (Barbosa et al., 2005). Como consequência de investimentos em tecnologia e pelo clima brasileiro favorável, o gênero *Eucalyptus* tornou-se a principal fonte de matéria prima para a indústria de papel e celulose oferecendo alta produtividade e ciclos de crescimento cada vez mais curtos (Viana et al., 2016). No Brasil, esta produtividade pode alcançar valores cerca de dez vezes mais elevados do que países como Finlândia, Portugal e Estados Unidos (CIB, 2008).

Assim, a produção de grandes quantidades de celulose gera uma quantidade enorme de resíduos, como cascas, costaneiras, cavacos e outros resíduos de processo. Além disto, outras espécies de eucalipto têm se revelado de grande potencial para projetos de bioenergia, como clones de alta produtividade de *E. urograndis* (Peng et al., 2009). Esta tendência tem aumentado significativamente o interesse pela utilização destas matérias-primas para a produção de etanol celulósico e outros importantes insumos para a indústria química. Além disto, o eucalipto é uma matéria-prima que não oferece nenhum risco à segurança alimentar (Gonzalez, 2011). Embora já existam estudos na literatura sobre o pré-tratamento por explosão a vapor de diferentes espécies de eucalipto, como *E. globulus* (Romaní, et al., 2013; Martín-Sampedro et al., 2012; Nunes e Pourquie, 1996), *E. benthamii* (Castro et al., 2014) e *E. grandis* (Park, et al., 2012; Emmel et al., 2003), a avaliação para esse fim de clones de *E. urograndis* ainda é inédita.

Conforme mencionado anteriormente, materiais lignocelulósicos são basicamente constituídos de celulose, hemiceluloses e lignina. A celulose é o componente orgânico mais abundante na natureza, pois constitui entre 40-50 % da parede celular de plantas superiores. É um homopolissacarídeo constituído por unidades de anidro-D-glucopiranoose unidas por ligações  $\beta$  glicosídicas do tipo (1 $\rightarrow$ 4) (Ramos, 2003). Conforme indicado na **Figura 3**, a celulose apresenta um terminal não-redutor correspondente a um grupamento hidroxila em C4 e terminal redutor contendo um carbono hemiacetálico (C1), também chamado de carbono anomérico (Klemm et al., 2005).



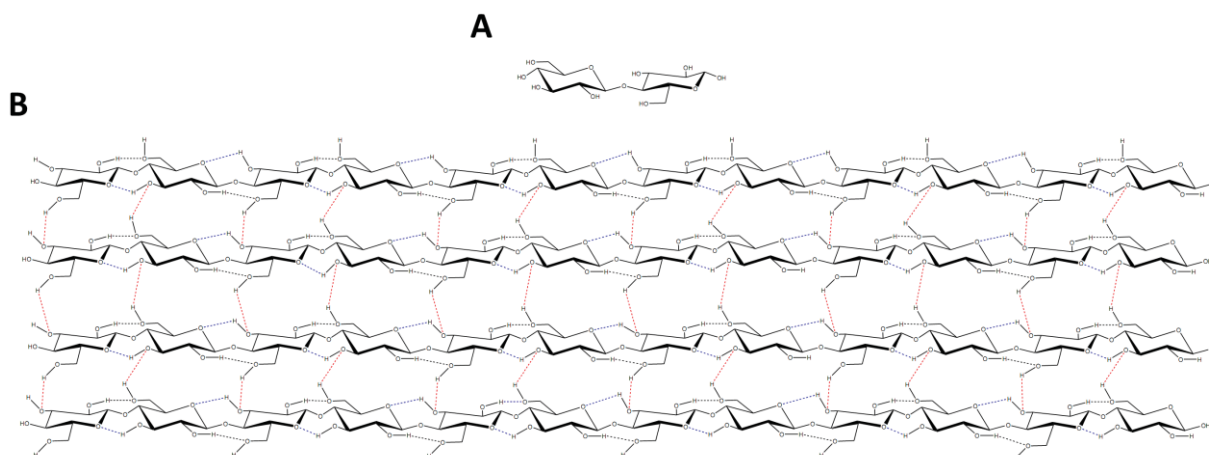
**Figura 3.** Estrutura molecular da celulose indicando os números dos átomos de carbono e os terminais redutor (extremidade direita na cor vermelha) e não-redutor (extremidade esquerda na cor verde) (Adaptado de Wertz et al 2010).

Em meio aquoso, ocorre a abertura e o fechamento do anel hemiacetálico, gerando dois isômeros de posição em C1 (epímeros) com a possibilidade da hidroxila ficar em posição axial ou equatorial em relação ao plano do anel. Um equilíbrio é atingido entre as formas  $\alpha$ -D-glucopiranoose, aberta e  $\beta$ -D-glucopiranoose, cuja ocorrência corresponde a 37,5 %, 0,5 % e 62 %, respectivamente. Essa reação é reversível e a interconversão entre as formas  $\alpha$  e  $\beta$  é chamada de mutarrotação (Fengel, Wegener, 1989).

A orientação equatorial das hidroxilas anoméricas dos anéis piranosídicos em conformação  ${}^4C_1$  confere linearidade às cadeias de celulose, resultando em agregados cuja estrutura supramolecular é estabilizada por forte arranjo de ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares envolvendo as hidroxilas presentes do carbonos C2, C3 e C6 (**Figura 4**). A estrutura da celulose ainda abriga regiões mais organizadas, denominadas cristalinas, e regiões mais acessíveis e de menor grau de



associação, denominadas amorfas. A unidade conformacional da celulose é a celobiose (4-O- $\beta$ -D-glucopiranosil- $\beta$ -glucopiranosose), enquanto que a glucose representa a sua unidade estrutural básica (Attala et al., 1993; Fengel, Wegener, 1989).

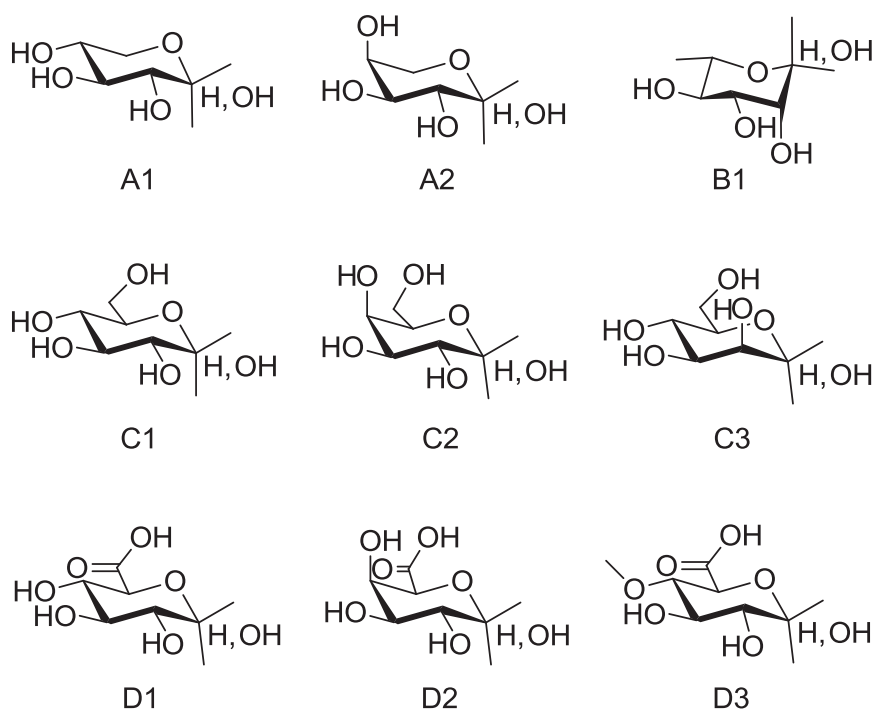


**Figura 4.** Estrutura da (A) celobiose e (B) celulose, mostrando o arranjo de ligações de hidrogênio intermoleculares (em vermelho) e intramoleculares (em azul) entre as cadeias lineares (Silveira et al., 2014).

A celulose pode apresentar diferentes graus de polimerização (GP). Por exemplo, a madeira apresenta GP em torno de 10000, enquanto que polpas celulósicas comerciais e celulose microcristalina têm este valor reduzido a 1500-2000 e 250-300, respectivamente (Pereira et al., 2003; Klemm et al., 2005). O GP representa o número de unidades de anidrogucose que forma cada cadeia polimérica e esse pode variar de acordo com o grau de maturação da parede celular, o processamento ao qual as fibras foram submetidas e o seu envelhecimento (Fengel e Weneger, 1989).

As hemiceluloses correspondem a uma família de heteropolissacarídeos que apresenta menor GP (em torno de 200) em relação à celulose e que está concentrada principalmente na camada primária e secundária da parede celular, intimamente associada à celulose e lignina. As hemiceluloses normalmente apresentam cadeias ramificadas ou parcialmente substituídas por carboidratos ou ácidos orgânicos, caracterizando um material de menor organização molecular do que a celulose (menor cristalinidade) cuja heterogeneidade é mais susceptível à degradação térmica, biológica ou química (Ramos, 2003). No entanto, na parede celular, as hemiceluloses encontram-se fortemente associadas às regiões cristalinas

da celulose por meio de ligações de hidrogênio, particularmente em seções lineares não substituídas da cadeia principal. Em termos gerais, as hemiceluloses correspondem de 20 a 30 % da composição total da madeira (Morais, 2005; Park e Kim, 2012), enquanto nas gramíneas estes valores podem variar de 20 a 40% (Rocha et al., 2012). Os monossacarídeos presentes nas hemiceluloses envolvem pentoses, hexoses e ácidos urônicos, conforme indicado na **Figura 5** (Gírio et al., 2010).

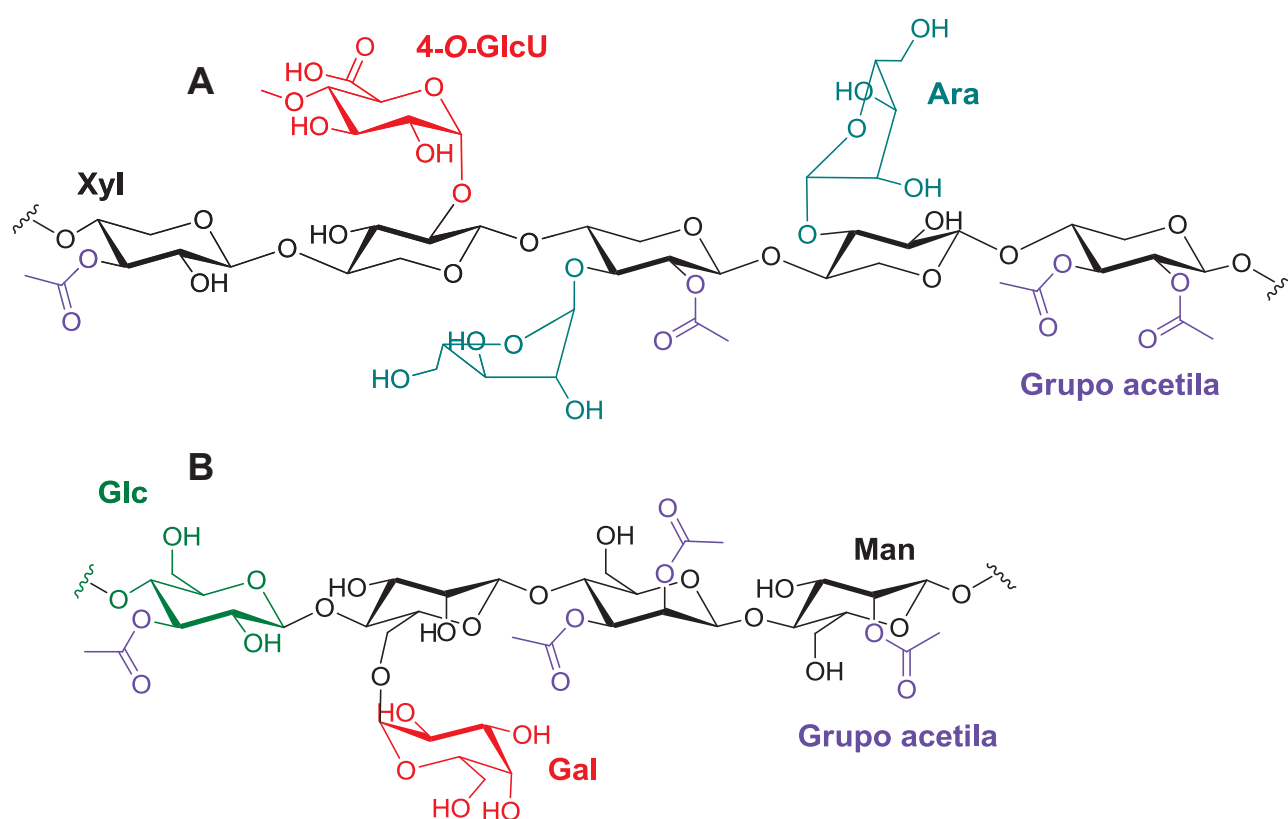


**Figura 5.** Estrutura dos monossacarídeos presentes em hemiceluloses e pectinas, divididos em: pentoses como (A1) D-xilose, (A2) L-arabinose; deoxi-hexoses como (B1) L-ramnose; hexoses como (C1) D-glucose, (C2) D-galactose e (C3) D-manose; ácidos urônicos como (D1) ácido D-glucurônico, (D2) ácido D-galacturônico e (D3) ácido 4-O-metil-D-glucurônico.

Xilanas e glucomananos são as hemiceluloses mais relevantes, sendo que as xilanas são as mais abundantes. Em gramíneas há o predomínio de hemiceluloses do tipo arabinoglucuronoxilanas, além de xiloglucanas em menor quantidade. Já em folhosas as glucuronoxilanas aparecem como componente principal e as glucomananos como minoritário, enquanto que, no caso das coníferas,

as galactoglucomananas estão presentes em maior quantidade e as arabinoglucuronoxilanas se encontram em menor quantidade (Gírio et al., 2010).

As hemiceluloses do tipo arabinoglucuronoxilanas (**Figura 6**) apresentam uma estrutura linear formada por unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1,4), onde resíduos de 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucuronopiranosil e  $\alpha$ -L-arabinofuranosil encontram-se unidas à cadeia principal por ligações  $\alpha$ -(1,2) e  $\alpha$ -(1,3), respectivamente. Já as xiloglucanas, que interagem com as microfibrilas de celulose por meio de ligações de hidrogênio, são formadas por unidades de D-glucose unidas por ligações  $\beta$ -(1,4) com 75 % de resíduos de D-xilosil ligados à cadeia principal, além de resíduos de L-arabinosil e D-galactosil em menor proporção (Gírio et al., 2010). Nas folhosas, uma a cada 10 unidades de D-xilopiranosose é substituída no C2 por grupamentos O-acetila (Coughlan e Hazlewood, 1993).



**Figura 6.** Representações esquemáticas de cadeias de (A) arabinoglucuronoxilanas e (B) galactoglucomananas (Adaptado de Gomes, 2016).

As glucuronoxilanas apresentam cadeia linear formada por unidades de D-xilopiranosose unidas por ligações  $\beta$ -(1,4), sendo que algumas destas unidades podem ser acetiladas em C2 ou C3 e conter ácido 4-O-metilglucurônico em  $\alpha$ -(1,2) a

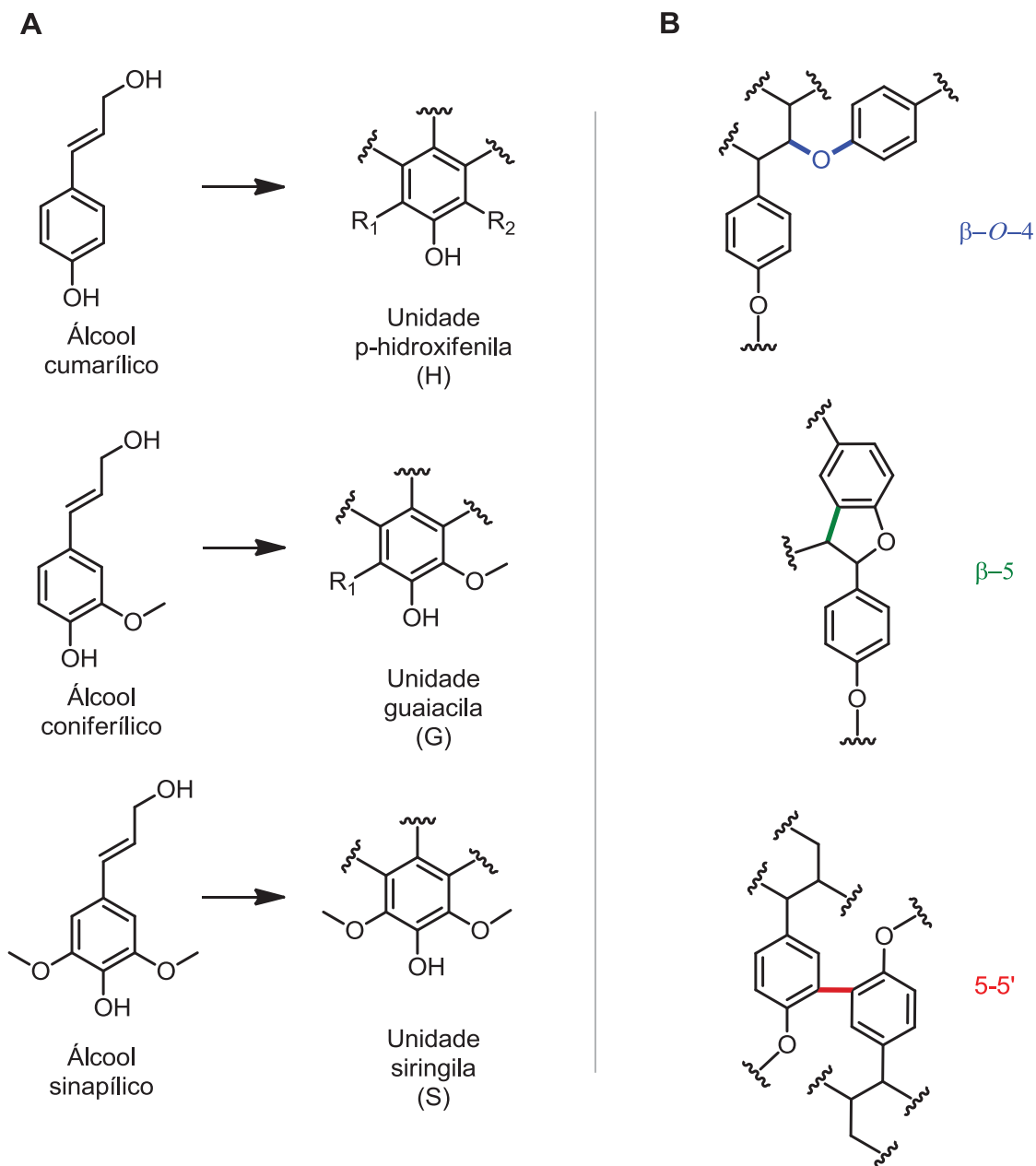
cada dez unidades da cadeia. No caso das glucomananas, estas apresentam a cadeia principal formada por unidades de D-glucopiranosose e D-manopiranosose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1,4) (Gírio et al., 2010).

As galactoglucomananas apresentam estrutura semelhante à das glucomananas, no entanto, são parcialmente acetiladas em C2 e C3 e substituídas por resíduos de  $\alpha$ -D-galactopiranosil ligadas em unidades de glucose ou manose por enlaces  $\alpha$ -(1,6). Neste caso, ainda podem conter um grupamento acetila a cada três ou quatro unidades de hexoses em média (Gírio et al., 2010).

Outros polissacarídeos são encontrados na parede celular vegetal em menor quantidade, tais como as pectinas, que são majoritariamente formadas por unidades de ácido- $\alpha$ -D-galacturônico e por açúcares neutros como a L-ramnose. Este componente pode contribuir para a firmeza, resistência mecânica e coesividade do tecido vegetal. Em geral, os materiais pécticos contêm mais de 50% dos grupos carboxílicos encontrados na parede celular (Popa e Spiridon, 2005).

Depois da celulose, a macromolécula mais abundante na natureza é a lignina, que chega a representar 20-30% da biomassa lignocelulósica produzida no planeta. Trata-se de uma matriz polifenólica amorfa não polissacarídica, altamente hidrofóbica e complexa, formada por reações de condensação entre derivados do álcool *p*-hidroxicinâmico com diferentes graus de metoxilação, os álcoois cumarílico (não metoxilado), coniferílico (monometoxilado) e sinapílico (dimetoxilado), que na estrutura tridimensional da lignina correspondem às unidades *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), respectivamente (**Figura 7A**) (Fengel e Wegener, 1989).

Nas plantas, a ocorrência de lignina se dá na lamela média e na parede secundária, sendo a última dividida em S1, S2 e S3 para as camadas externa, intermediária e interna, respectivamente. O teor de lignina pode variar entre elas, sendo dificilmente encontrada em S3. Na parede primária, S1 e S2, as unidades G são mais frequentes. Já na lamela média são encontradas maiores quantidades de unidades H, enquanto que a unidades S está mais presente nas paredes em formação (Achyuthan et al., 2010). As ligninas presentes no eucalipto apresentam unidades G e S majoritariamente, enquanto que o bagaço de cana-de-açúcar apresenta os três tipos G, H e S em sua estrutura.



**Figura 7.** Estrutura (A) dos álcoois precursores da lignina com unidades G, H e S, e (B) principais ligações presentes na lignina (Adaptado de Ramos et al., 2016 e Santos, 2001).

A biossíntese da lignina ocorre a partir da desidrogenação enzimática dos álcoois precursores (álcool cumarílico, coniferílico e sinapílico) formando radicais passíveis de deslocalização eletrônica. Estes radicais acoplam-se entre si de maneira randômica, formando um polímero tridimensional com possibilidades ilimitadas de combinação (Hatakeyama e Hatakeyama, 2010; Ramos et al. 2017). Na literatura, vários autores identificam a ligação  $\beta$ -O-4 como a ligação dominante na

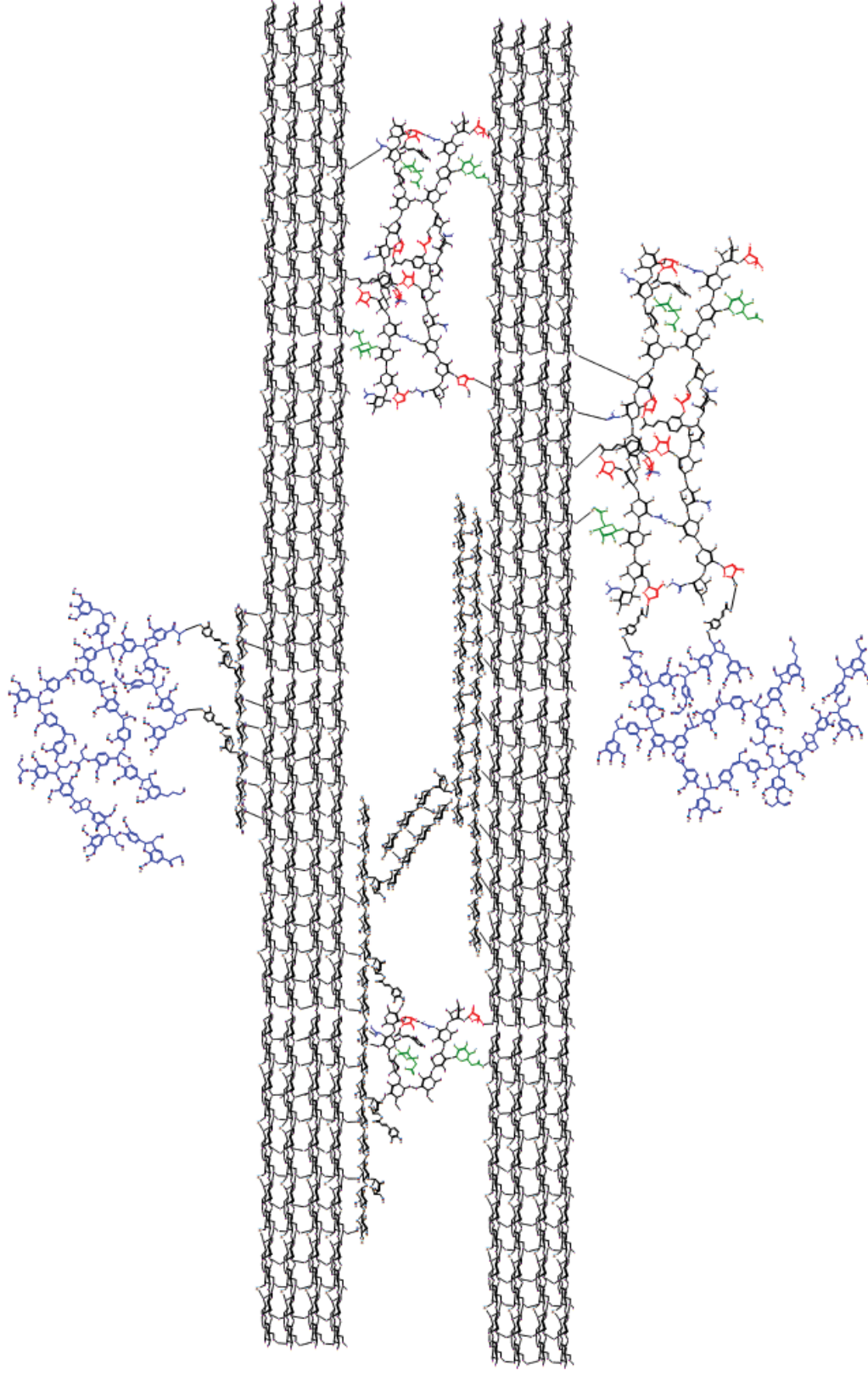
estrutura da lignina, com participação entre 40 e 60% (Veloso et al., 1993; Picart et al 2015; Zhang et al 2016), enquanto que as ligações  $\beta$ -5 e 5,5' representam juntas em torno de 20% (Santos, 2008) (**Figura 7B**). Outras ligações podem ser frequentemente encontradas, como ligações éter que envolvem cadeias alifáticas e anéis aromáticos ( $\alpha$ -O-4') e ligações carbono-carbono entre cadeias alifáticas C3 ( $\beta$ - $\beta'$ ,  $\alpha$ - $\alpha'$ ,  $\alpha$ - $\beta'$ ), entre as cadeias alifáticas e os anéis aromáticos ( $\beta$ -5',  $\beta$ -1',  $\alpha$ -1',  $\beta$ -6') e entre carbonos aromáticos (5-5') (Veloso et al., 1993). Um modelo estrutural de um fragmento de lignina está apresentado na **Figura 8**, sendo que sua interligação com fragmentos de hemiceluloses está representado pela ocorrência de pontes diferúlicas, que correspondem a duas moléculas de ácido ferúlico unidas por ligação

C-C do tipo 5-5'. No entanto, é importante ressaltar que esse modelo foi elaborado para bagaço de cana e não para madeiras duras como o eucalipto.

A lignina é um componente de grande importância para a planta. No entanto, em muitos processos industriais que utilizam materiais lignocelulósicos como matéria-prima, seja na indústria de papel e celulose ou na produção de biocombustíveis líquidos como o etanol, sua remoção é muito importante para conferir eficiência ao processo e propriedades adequadas ao produto final. Porém, a exigência de uma ou mais etapas de deslignificação gera aumentos significativos no investimento de capital e no custo operacional do processo. Dessa forma, o uso da deslignificação dificilmente se justifica em processos cujo produto não oferece um retorno à altura do investimento exigido.

Além dos componentes majoritários da lignocelulose, também são encontrados componentes de baixa massa molar, os quais incluem uma variedade de compostos orgânicos cuja presença é governada por uma série de fatores, entre eles os de natureza genética e climática. Os extraíveis são geralmente compostos por lipídeos, ácidos graxos, álcoois graxos, fenóis, terpenos, esteroides, resinas ácidas e ceras, dentre outras substâncias que se apresentam na forma de monômeros, dímeros ou polímeros (Santos, 2008). Estes constituintes são frequentemente responsáveis por determinadas características da planta, como cor, cheiro, resistência natural de agentes deterioradores e sabor. Os extraíveis ocorrem na casca, folhas, flores, frutos e sementes e quase sempre a quantidade nessas partes da planta é proporcionalmente maior que na madeira ou lenho propriamente dito (Klock, 2006).





**Figura 8.** Representação do complexo lignina-carboidrato de bagaço de cana, mostrando agregados de celulose com fragmentos de xiloglucanas e arabinofuruloil-xilanas ligados covalentemente a um fragmento de lignina (em azul) (Silveira et al., 2014).

## 2.2 PRÉ-TRATAMENTO

A lignocelulose é um material resistente à biodegradação. Desta forma, para obter um hidrolisado com elevado teor de açúcares fermentescíveis, faz-se necessário superar esta resistência natural, também denominada recalcitrância. O pré-tratamento representa uma etapa “chave” do processo de produção de etanol celulósico por acarretar uma diminuição dos fatores estruturais que dificultam a reatividade de materiais lignocelulósicos a processos biológicos como a hidrólise enzimática (Balat, 2011; Chandra et al., 2007).

Vários métodos de pré-tratamento têm sido propostos na literatura para o aproveitamento de materiais lignocelulósicos. Tais técnicas são baseadas em processos mecânicos, físicos, químicos, biológicos ou na combinação destes (**Tabela 1**). Dentre estes processos, podem ser destacados os que utilizam hidrólise ácida (Hsu et al., 2009), *organosolv* (Mood et al., 2013), amônia líquida (AFEX, do inglês *Ammonia fibre expansion*) (Gao et al., 2010; Li et al., 2010), explosão a vapor (Sun et al., 2009; Pitarelo et al., 2012; Ramos et al., 2015) e hidrólise alcalina (Curreli et al., 1997; Zheng et al., 2009), todos com o propósito de desagregar a estrutura da lignocelulose para produzir combustíveis renováveis ou insumos químicos a partir da biomassa. De acordo com Ramos (2003), as melhores opções de pré-tratamento são aquelas que combinam métodos físicos e químicos.

A hidrólise e remoção das hemiceluloses é um dos principais efeitos do pré-tratamento ácido sobre a estrutura e composição química da biomassa lignocelulósica (Zhao et al., 2012). Isso pode ser explicado pela ocorrência de ligações glicosídicas lábeis em sua estrutura, cuja acessibilidade química advém da heterogeneidade de suas cadeias polissacarídicas. O pré-tratamento ácido é normalmente realizado em temperaturas na faixa de 140 a 200 °C, podendo promover, dependendo de alguns fatores, recuperações acima de 80 % das hemiceluloses na forma de um hidrolisado (Lima et al., 2013). Dentre os principais fatores que determinam a eficiência de um pré-tratamento ácido destacam-se a temperatura, a concentração do catalisador, o tamanho de partícula do material, o projeto do reator e o tempo de residência da biomassa no seu interior.

**Tabela 1.** Principais técnicas de pré-tratamento que já foram aplicadas a materiais lignocelulósicos (Ogeda e Petri, 2010; Neves, 2014; Gomes, 2016).

|           | Processo                     | Descrição   | Referências   |
|-----------|------------------------------|---|---|
| BIOLÓGICO | Fungos ou enzimas            | Biodegradação da lignina e da hemicelulose. Os fungos da podridão branca são os mais utilizados por produzirem lacases e peroxidases que degradam a lignina   | Ishola et al., 2014; Ma et al., 2010                          |
|           | Moagem                       | Diminuição do tamanho de partícula e aumento da área superficial da biomassa  | Teixeira et al., 2013   |
| FÍSICO    | Irradiação                   | Absorção de energia no interior da biomassa formando radicais que são capazes de romper as ligações do complexo lignina-carboidrato   | Ribeiro et al., 2013  |
|           | Ultrassom                    | Modifica a estrutura da lignocelulose através do processo de cavitação  | Silva et al., 2015  |
| QUÍMICO   | Hidrólise ácida              | Hidrólise das hemiceluloses, modificação da estrutura da lignina e aumento da acessibilidade da celulose  | Pappas et al., 2011; Zhou et al., 2014                        |
|           | Extração alcalina            | Extração da lignina e hidrólise de ligações aril-éter, diminuindo sua massa molar   | Rabelo et al., 2014<br>Silva et al., 2015                     |
|           | Líquido iônico               | Solubilização dos carboidratos e/ou lignina devido a sua alta polaridade e fortes interações intermoleculares com a matriz  | Silveira et al., 2015b; Weerachanchai e Lee, 2014             |
|           | CO <sub>2</sub> supercrítico | Hidrólise ácida parcial, aumento da área superficial e diminuição do grau de polimerização dos polissacarídeos  | Gao et al., 2010; Pan e Tan, 2014                             |
| COMBINADO | Solvente orgânico            | Deslignificação seletiva da biomassa, cuja eficiência pode ser aumentada com o uso de um catalisador ácido exógeno  | Torre et al., 2013  |
|           | AFEX                         | Exposição da biomassa à amônia líquida sob altas pressões e temperaturas (160 a 180 °C), seguido de descompressão do conteúdo do reator em um tanque coletor  | Li et al., 2010; Silveira et al., 2015a                       |
|           | Hidrotermólise               | Hidrólise ácida parcial das hemiceluloses e redistribuição da lignina via auto-hidrólise, tornando a celulose mais acessível à hidrólise enzimática   | Pérez et al., 2008; Zhuang et al., 2016                       |
|           | Explosão a vapor             | Desconstrução da estrutura da parede celular via hidrólise ácida parcial das hemiceluloses e redistribuição da lignina. Pode ser realizada na ausência ou na presença de catalisadores exógenos ácidos ou básicos | Carrasco et al., 2010; Rocha et al., 2012; Ramos et al., 2015 |

O pré-tratamento com solventes orgânicos (ou *organosolv*) pode empregar metanol, etanol, acetona, tetraidrofurano ou etileno glicol e a principal característica desse processo é a hidrólise das ligações mais internas da estrutura da lignina e do complexo lignina-carboidrato e isso resulta na recuperação de uma lignina mais pura, podendo com isto representar um coproduto de grande interesse comercial para aplicações em biorrefinarias (Wildschut et al., 2013). O processo de *organosolv* exige que o solvente percole a biomassa removendo componentes de baixa massa molar e promovendo, particularmente no caso da catálise ácida, a hidrólise das ligações aril-éter da lignina, o que favorece a sua remoção. Para que seja considerado um bom solvente, esse deve apresentar baixa massa molar, baixo custo, grande disponibilidade e baixo ponto de ebulição, de modo a facilitar tanto a extração quanto a sua recuperação e reuso (Mood et al., 2013). Como dito anteriormente, esse processo pode ser realizado com líquidos de baixo (*e.g.*, etanol, metanol, acetona e gama-valerolactona) ou mais alto (*e.g.*, etilenoglicol ou glicerol) ponto de ebulição, na presença ou não de um catalisador ácido (Terán Hilares et al., 2017).

O processo AFEX diferentemente dos pré-tratamentos de natureza ácida, quase nenhuma hidrólise de hemiceluloses ocorre durante o processo, resultando na recuperação de sólidos em alto rendimento, com teor de umidade muito baixo e alta acessibilidade química. Além disso, os sólidos resultantes desse processo exibem alta área superficial e baixo grau de cristalinidade, com a possibilidade de transformação da forma alomórfica do componente celulósico. Este processo também pode fornecer alguma modificação química da lignina, principalmente devido à clivagem de ligações aril-éter, produzindo fragmentos de lignina de massa molar intermediária que podem ser facilmente extraídos (Silveira et al., 2015a).

Atualmente, há muito interesse nos princípios da química verde e, em particular, na substituição de solventes comuns por alternativas mais seguras e pelo uso de matérias-primas renováveis que ajudam a tornar os processos de pré-tratamento mais sustentáveis. A água é um dos melhores candidatos porque é econômica, ambientalmente amigável e pode ser usada em uma ampla gama de processos para a conversão de biomassa em combustíveis líquidos. Além disso, a necessidade de processar biomassas com alto teor de umidade também incentivou o desenvolvimento de tecnologias hidrotérmicas. O tipo de conversão em processos hidrotérmicos depende da temperatura e da pressão empregadas. Em geral,

temperaturas inferiores a 200 °C produzem um material fibroso, enquanto que em temperaturas de 200 a 350 °C, a formação de uma corrente líquida predomina em processo denominado liquefação hidrotérmica. Os processos hidrotérmicos são geralmente definidos como tecnologias químicas e físicas que utilizam água líquida ou supercrítica em altas temperaturas (100-600 °C) e altas pressões (acima do ponto de saturação de 400 bar, sendo que 1 bar =  $1 \times 10^5$  Pa). As etapas do pré-tratamento hidrotérmico podem ser explicadas da seguinte forma: em temperaturas de aproximadamente 100 °C, componentes solúveis em água (extrativos incluindo carboidratos) se dispersam na água, enquanto que a hidrólise das hemiceluloses e de parte da celulose (particularmente em oligômeros) começa em temperaturas superiores a 150 °C. Em temperaturas acima de 200 °C e 10 bar de pressão, a biomassa processada torna-se uma suspensão de alta viscosidade, e quando acima de 300 °C e 100 bar, a biomassa é liquefeita gerando a recuperação de um produto oleoso (Silveira et al, 2015). Embora os processos hidrotérmicos sejam muito atraentes para processamento convencional de biomassa, eles têm algumas limitações, como a necessidade de equipamentos especializados para resistir a altas temperaturas e pressões e, por vezes, a meios corrosivos devidos à alta acidez e ao elevado nível de oxigênio dissolvido. No caso da água supercrítica, a energia necessária para alcançar atingir o ponto crítico também precisa ser contabilizada (Silveira et al, 2015).

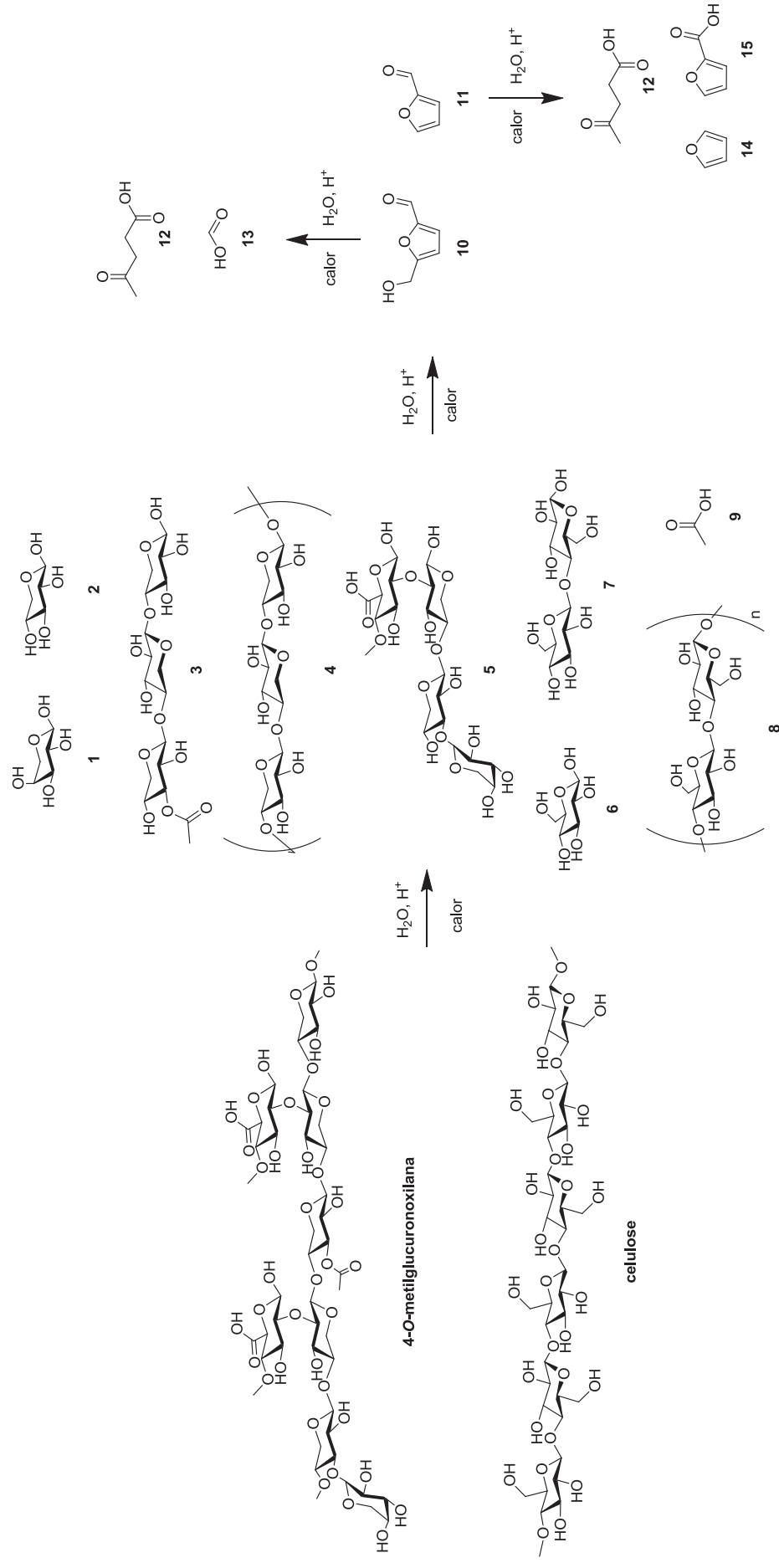
Um dos processos mais estudados para o pré-tratamento da biomassa é a explosão a vapor (Cara et al., 2008; Carrasco et al., 2010; Rocha et al., 2012; Ramos et al., 2015), que é conhecida por atuar tanto química quanto fisicamente na estrutura da biomassa (Ramos, 2003). A explosão a vapor, que foi inicialmente introduzida e patenteada por William H. Mason em 1926, aumenta a susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática (Baudel, 2006; Martin-Sampedro et al., 2014) por promover a desconstrução da estrutura associativa da parede celular vegetal, aumentando a área superficial de contato particularmente através da hidrólise ácida parcial das hemiceluloses (Pitarelo et al., 2012; Schütt et al., 2012). Entretanto, o efeito do pré-tratamento é dependente da composição da biomassa e das condições experimentais empregadas (Hendriks e Zeeman, 2009). Na explosão a vapor, a biomassa é tratada com vapor saturado a temperaturas entre 140 e 240 °C por alguns minutos e, em seguida, é submetida a uma rápida descompressão à pressão atmosférica (Ramos, 2003; Hendriks e Zeeman, 2009). Este processo pode ocorrer

na ausência ou na presença de catalisadores externos, como  $\text{CO}_2$  (Kim e Hong, 2001),  $\text{SO}_2$  (Carrasco et al., 2010) ou soluções diluídas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Cara et al., 2008; Emmel et al., 2003) ou  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Gámez et al., 2006). Neste pré-tratamento, o vapor penetra e condensa no interior da estrutura lignocelulósica, carregando consigo ou não a presença de catalisadores exógenos. Durante a descompressão, esta água se expande rapidamente e é parcialmente evaporada, gerando literalmente uma explosão que auxilia na desconstrução da estrutura coesiva do material de origem (Wang et al., 2015; Duque et al., 2016).

No caso de nenhum catalisador exógeno ser adicionado à explosão a vapor, o processo é chamado de auto-hidrólise, onde a quebra das ligações glicosídicas é dependente dos ácidos liberados a partir da própria biomassa. Muito embora o ácido acético seja considerado o principal catalisador ácido da auto-hidrólise, outros ácidos orgânicos também são formados a partir da decomposição de pentoses e hexoses (ácido levulínico e ácido fórmico) sob condições de alta pressão e temperatura (**Figura 9**) (Ramos, 2003). Durante o processo de explosão a vapor, todos os componentes da biomassa sofrem hidrólise, mas as hemiceluloses são mais fortemente comprometidas por este tipo de reação. A explosão a vapor não gera apenas monossacarídeos, mas também oligômeros de alta e baixa massa molar, além de outros produtos de desidratação de hexoses e pentoses, como hidroximetilfurfural e furfural, respectivamente (Ramos, 2003). A extensão de cada reação é dependente das condições de pré-tratamento de tempo, temperatura e presença e concentração de catalisadores. Neste pré-tratamento a fração insolúvel é recuperada com altos teores de glucanas (celulose) e lignina parcialmente modificada, sendo que a maior parte desta lignina pode ser removida por extração alcalina.

Outro método de pré-tratamento aplicado a materiais lignocelulósicos é a deslignificação alcalina, sendo  $\text{NaOH}$  a base mais utilizada nesse processo. O pré-tratamento alcalino promove intensa deslignificação da biomassa, aumentando a reatividade das fibras sob temperaturas e pressões bem mais moderadas que as utilizadas no pré-tratamento por explosão a vapor. Além disto, o custo dos reagentes e do procedimento operacional tende a ser mais baixo (Baudel, 2006). As vantagens do uso de alcalinidade sobre os métodos ácidos são o uso de condições mais amenas e a remoção da lignina sem causar a degradação dos polissacarídeos da biomassa (Balat, 2011).





**Figura 9.** Compostos formados durante a explosão a vapor a partir da celulose e das hemiceluloses (4-O-metilglucuronoxilana): (1) arabinose, (2) xilose, (3) xilooligômeros acetilados (GP 3), (4) xilooligômeros de alta massa molecular, (5) oligossacarídeos, (6) glucose, (7) celobiose, (8) celoo-oligômeros, (9) ácido acético, (10) hidroximetilfurfural, (11) furfural, (12) ácido levulínico, (13) ácido fórmico, (14) furano e (15) ácido 2-furóico (Adaptado de Ramos, 2003).



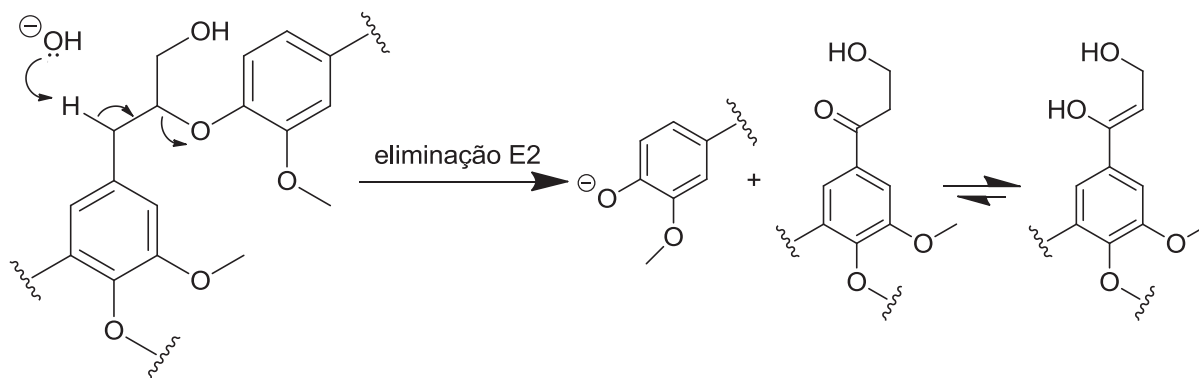
Segundo Kim e Hong (2001), um pré-tratamento efetivo deveria remover todos os grupamentos acetila e reduzir a quantidade de lignina do substrato em até pelo menos 10 %, o que se adequa à realidade da deslignificação alcalina. Assim, a remoção da lignina aumenta a efetividade da enzima por eliminar sítios de adsorção não produtiva e aumentar o acesso desta aos polissacarídeos do substrato.

A deslignificação parcial facilita o contato do meio alcalino com os carboidratos, promovendo o inchamento da biomassa e o aumento de sua superfície de contato. Isto facilita ainda mais a migração da água para dentro da estrutura que, uma vez presente, auxilia o rompimento das ligações de hidrogênio entre os polissacarídeos da parede celular (Balat, 2011).

A deslignificação alcalina tem como característica redução da cristalinidade da celulose, rompimento das ligações mais lábeis dos complexos lignina-carboidrato, diminuição do grau de polimerização pela clivagem da ligação glicosídica dos polissacarídeos e, mais importante, desestruturação da lignina através do rompimento das ligações aril-éter do tipo  $\beta$ -O-4, cuja proposta mecanística de eliminação E2 é apresentada na **Figura 10** (Chen et al., 2013; Zheng et al., 2014; Singh et al., 2015; Ramos et al., 2017). A base no meio abstrai o próton do carbono  $\alpha$  e o par de elétrons da ligação remanescente forma a ligação  $\pi$  entre carbonos  $\alpha$  e  $\beta$ , quebrando desta forma a ligação  $\beta$ -O-4.

Uma alternativa ao pré-tratamento da biomassa é o uso de ultrassom, que é conhecido por diminuir o grau de polimerização da celulose e auxiliar na redução do tamanho das partículas (Ingram; Wood; Aldrich, 1997). Este processo pode ser influenciado por variáveis como temperatura, tempo, potência do ultrassom e propriedades macroestruturais do substrato. Dentre as principais vantagens das tecnologias de pré-tratamento assistido por ultrassom estão a possibilidade do uso de menores temperaturas, a diminuição no tempo de reação e a eventual redução na quantidade de catalisador necessária para o pré-tratamento (Silveira et al., 2015a). As ondas ultrassônicas, quando aplicadas a um líquido, causam ciclos de compressão (pressão positiva) e expansão (pressão negativa) formando bolhas de cavitação. Portanto, após ciclos contínuos de compressão e expansão, as bolhas de cavitação se expandem para um tamanho crítico e colapsam, dissipando calor pela liberação súbita da pressão em um ponto específico do meio reacional (Silveira et al., 2015a).

Um pré-tratamento, para ser considerado efetivo, deve promover aumentos na área superficial e na porosidade da biomassa, modificar e remover lignina, despolimerizar parcialmente as hemiceluloses, ser economicamente viável e limitar os custos associados ao tratamento dos resíduos. Além disto, deve produzir substratos susceptíveis aos processos de hidrólise e não gerar inibidores à hidrólise e fermentação (Su e Cheng, 2002; Kumar et al., 2009; Silveira et al., 2015a).



**Figura 10.** Proposta mecanística da quebra das ligações β-O-4 (Adaptado de Ramos et al., 2017).

## 2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A etapa posterior ao pré-tratamento é a sacarificação dos polissacarídeos da biomassa (celulose e hemicelulose) em açúcares fermentescíveis, etapa essa realizada por diferentes classes de enzimas que visam a conversão de todo o carboidrato disponível no substrato. No caso da celulose, a hidrólise enzimática envolve majoritariamente três classes de hidrolases: as celobiohidrolases (CBH - EC 3.2.1.91), também conhecidas como exo-β-1,4-glucanases (ExG), as endo-β-1,4-glucanases (EnG; EC 3.2.1.4), e as β-glucosidases (βG; EC 3.2.1.21) (Vinzant et al., 2001). As celulasas comerciais em sua grande maioria são produzidas por *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) e este foi o primeiro fungo a ser utilizado na produção industrial dessas enzimas (Ogeda e Petri, 2010).

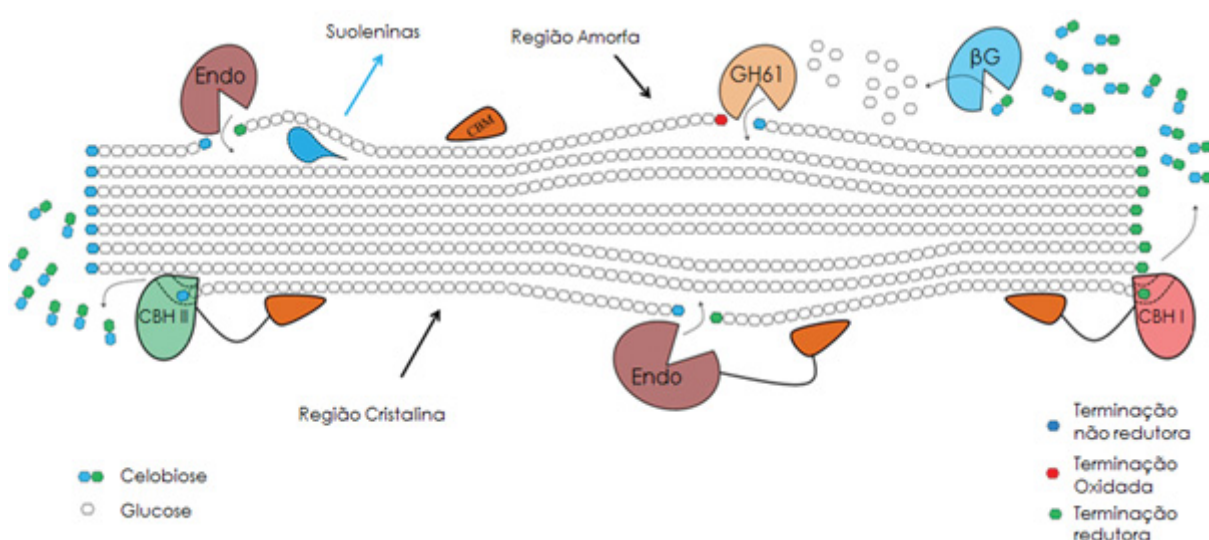
Trata-se de um fungo filamentoso que produz um complexo enzimático completo, contendo 4 endoglucanases (*TrCel7B* ou EG-I, *TrCel5A* ou EG-II, *TrCel12A* ou EG-III e *TrCel45A* ou EG-V), sendo que *TrCel7B* (EG-I) é principal enzima de ação endoglucanásica, correspondendo a 6–10 % da composição do complexo (Foreman et al., 2013; Silveira et al., 2014). Já as ExGx podem ser

classificadas em dois grupos, CBH-I e CBH-II (TrCel7A e TrCel6A, respectivamente), sendo a primeira conhecida pela processividade a partir do terminal redutor para o não redutor e a segunda pela atuação no sentido contrário. A CBH-I representa aproximadamente 50% do total das enzimas, sendo considerada a principal componente do sistema (Wertz et al., 2010). Por fim, a celobiose e outros oligômeros de baixa massa molar são reduzidos à glucose pela ação das  $\beta$ G, que estão presentes em duas formas (BGI e BGII) no complexo enzimático desse fungo (Qi et al., 2017). No entanto, sabe-se que as enzimas de *T. reesei* são normalmente deficitárias de atividade  $\beta$ -glucosidásica.

De acordo com Wood e McCrae (1979), a hidrólise enzimática se inicia com a formação de terminais redutores e não redutores ao longo da cadeia de celulose e isto se deve majoritariamente à ação das EnGs que cortam interiormente as cadeias e produzem celobiose como produto majoritário. Assim, as enzimas do complexo celulolítico agem de forma sinérgica (**Figura 11**) e esse sinergismo faz com que a velocidade de formação de produtos solúveis seja maior do que a velocidade de ação isolada destas enzimas (Sandgren et al., 2005). A cooperação entre as enzimas é importante porque as celulasas podem ser inibidas pelo acúmulo dos produtos da hidrólise, particularmente a celobiose no caso das exoglucanases.

Diferença estruturais entre os sítios catalíticos de EnGs e ExGs explicam os seus modos de ação durante a hidrólise de materiais celulósicos: a primeira o possui na forma de fenda, enquanto a segunda, em formato de túnel (Rabinovich et al., 2002). Assim, as EnGs atuam majoritariamente nas regiões não cristalinas e promovem a quebra de ligações glicosídicas ao longo da cadeia celulósica, gerando duas novas extremidades de cadeia, o que promove a relação de sinergia do tipo endo-exo. Enquanto isso, as ExGs adsorvem na superfície do substrato para que a cadeia de celulose adentre o túnel catalítico, que libera celobiose a cada ciclo de reação (Beckham et al. 2010). Tanto as EnG como as ExG podem exibir em sua estrutura um módulo de ligação ao carboidrato (CBM, do inglês *carbohydrate binding module*), um peptídeo majoritariamente não hidrolítico que tem alta afinidade pelos polissacarídeos e é responsável pela adsorção eficiente da enzima na superfície do substrato (Várnai et al. 2013). Para se ligar à parte cristalina da celulose, os CBMs de *T. reesei* têm três resíduos de tirosina (Tyr), além de aspargina (Asn) e glutamina (Gln), que são capazes de formar ligações de hidrogênio com a celulose.

Outras proteínas também estão envolvidas neste processo de hidrólise, como suoleninas e GH61 (glicosil-hidrolase família 61, atualmente AA9 - *Auxiliary Activities family 9*), sendo que esta última pertence à classe das monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs - do inglês *oxidative lytic polysaccharide monooxygenases*). Estudos recentes têm mostrado que a GH61 potencializa a ação das enzimas hidrolíticas, principalmente nas regiões cristalinas, resultando em rendimentos de hidrólise significativamente maiores (Harris et al., 2010; Horn et al., 2012).



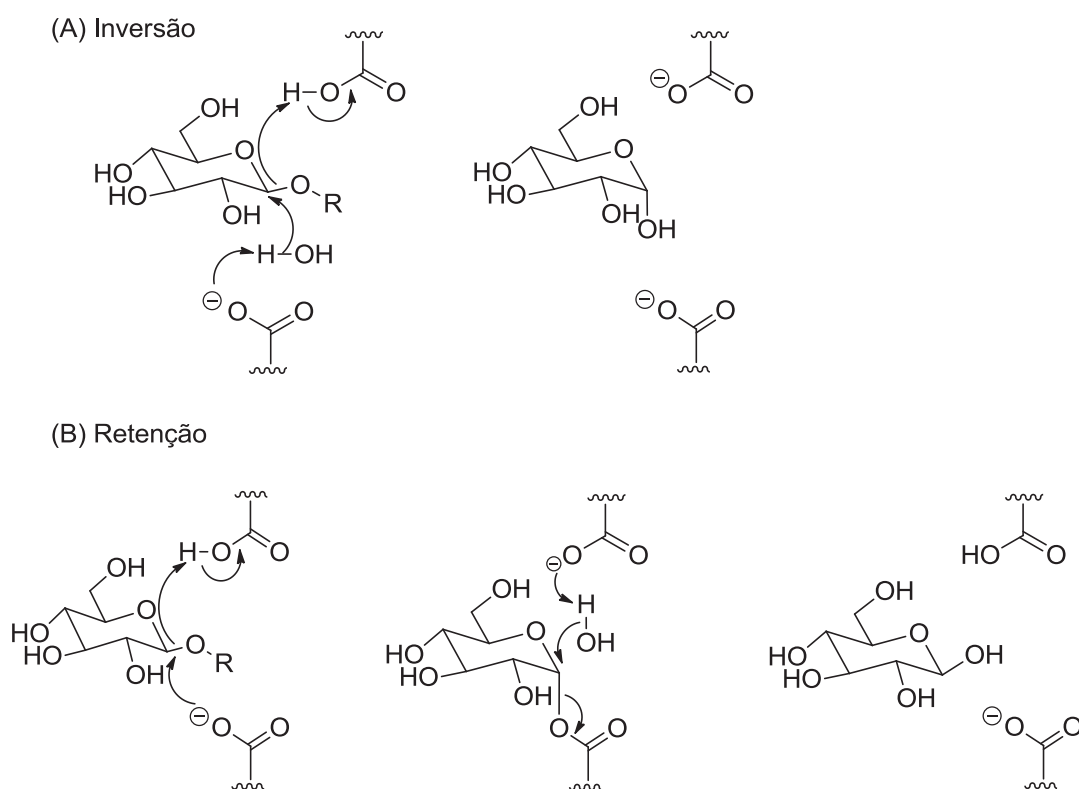
**Figura 11.** Sinergismo entre o complexo celulolítico durante a hidrólise enzimática da celulose (Silveira et al., 2014).

As GH61 são cobre-dependentes, sendo que a clivagem oxidativa exige a presença de um composto doador de elétrons. Essa oxidação ocorre no C1 da glucose, entretanto, as GH61 são também capazes de oxidar em C4 e C6 (Horn et al., 2012; Levasseur et al., 2013). A ação das suoleninas ocorre através de um inchamento das cavidades, perturbando a estrutura das ligações químicas envolvidas e, portanto, aumentando a susceptibilidade do substrato à hidrólise enzimática (Arantes, Saddler, 2010).

Dois mecanismos principais de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ) são sugeridos para a hidrólise da celulose (Melo e Carvalho, 2006), podendo essa ocorrer por inversão ou por retenção da configuração do carbono anomérico (C1). No mecanismo de inversão (**Figura 12A**), um resíduo de carboxilato desprotona uma molécula de água do meio. O par de elétrons do oxigênio da ligação glicosídica

$\beta$ -(1-4) desprotona uma segunda molécula de ácido carboxílico gerando íon carboxilato no meio, resultando na inversão da estereoquímica do C1.

A possibilidade do ânion carboxilato também atuar como nucleófilo no ataque ao anel glicosídico enseja a ocorrência de um segundo tipo de mecanismo de hidrólise, no qual observa-se a retenção de configuração (**Figura 12B**). Este se inicia com um ataque nucleofílico do íon carboxilato direto ao C1, e o par de elétrons do oxigênio glicosídico desprotona uma molécula de ácido carboxílico liberando no meio outro íon carboxilato. Em uma segunda etapa este íon carboxilato formado desprotona uma molécula de água e o íon hidróxido faz um ataque nucleofílico ao C1, liberando o outro grupo carboxilato.



**Figura 12.** Representação dos mecanismos para clivagem das ligações  $\beta$ -(1-4) com (A) inversão e (B) retenção de configuração (Melo e Carvalho, 2006).

A distância entre os resíduos ácidos envolvidos na catálise determina o mecanismo de ação. Quando esta distância for em média de 5,5 Å, a reação levará à retenção e quando for superior ou em torno de 10 Å, esta se dará pelo mecanismo de inversão (Cairns e Esen, 2010).

Nos últimos anos, não apenas a descoberta de novas celulases como a elucidação dos mecanismos de regulação destas em diferentes microrganismos tem sido priorizada por vários grupos de pesquisa (Rabinovich et al., 2002, Arantes et al., 2014; Walton e Davies, 2016; Bhardwaj et al., 2017). Neste sentido, as celulases do fungo *Trichoderma reesei* são as mais intensamente estudadas e mais comumente utilizadas tanto em laboratórios e quanto em escala piloto para a produção de etanol celulósico (Menon e Rao, 2012; Van Dyk e Pletschke, 2012; Treebupachatsakul et al., 2015; Fang et al., 2015). Por outro lado, várias empresas buscam o desenvolvimento de preparações mais eficientes para aplicação neste ramo de pesquisa e desenvolvimento. Em 2009, a Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca) lançou a Cellic CTec, uma mistura de celulases (endo e exo-glucanases),  $\beta$ -glucosidases e enzimas auxiliares que atuam em sinergia durante a hidrólise da celulose. Esse coquetel enzimático foi especialmente desenvolvida para atuar no processo de produção de etanol celulósico a partir de uma grande variedade de biomassas. O complexo celulásico Cellic CTec3 é considerado o mais desenvolvido desta linha, pois, apresenta uma eficiência 1,5 vezes maior na conversão de materiais lignocelulósicos do que seu antecessor, Cellic CTec2 (Novozymes, 2012).

## 2.4 FERMENTAÇÃO

Após a etapa de hidrólise, o próximo passo é a fermentação dos hidrolisados a etanol e dióxido de carbono pela ação de um determinado grupo de organismos unicelulares denominados leveduras, em condições de anaerobiose (Hagman et al., 2012). Na teoria, a cada 100 g de glucose são produzidos 51,2 g de etanol e 48,8 g dióxido de carbono, mas, na prática, os microrganismos também utilizam parte da glucose para o seu crescimento (Pandey et al., 2000).

Na fermentação alcoólica a primeira etapa é a glicólise, na qual a molécula é degradada por meio de uma série de reações catalisadas por 10 enzimas específicas em duas fases (investimento e pagamento), gerando duas moléculas de piruvato (**Tabela 2**).

Na fase preparatória ou de investimento, que engloba as cinco primeiras etapas, não ocorre armazenamento de energia. Na realidade, duas moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) são investidas nas reações de fosforilação. Na etapa 1 ocorre a fosforilação da glucose com a doação de um fosfato da molécula de ATP,

sendo esta uma reação irreversível e com consumo de energia. Já no próximo passo 2, a glucose-6-fosfato sofre isomerização reversível através da enzima fosfo-hexose-isomerase, gerando frutose-6-fosfato que na etapa 3, é fosforilada pelo ATP pela enzima fosfofrutoquinase em reação novamente irreversível e com gasto de energia. As etapas 4 e 5 envolvem a clivagem da frutose-1,6-bifosfato pela frutose-1,6-bifosfato-aldolase e as trioses geradas sofrem interconversão pela enzima triose-fosfato-isomerase, respectivamente. Dentre as etapas descritas acima, as mais importantes são as que consomem ATP formando glucose-6-fosfato e frutose-1,6-bifosfato, que correspondem às etapas 1 e 3, respectivamente (Azevedo, 2009; Nelson e Cox, 2014).

**Tabela 2.** Enzimas envolvidas e produtos gerados na glicólise.

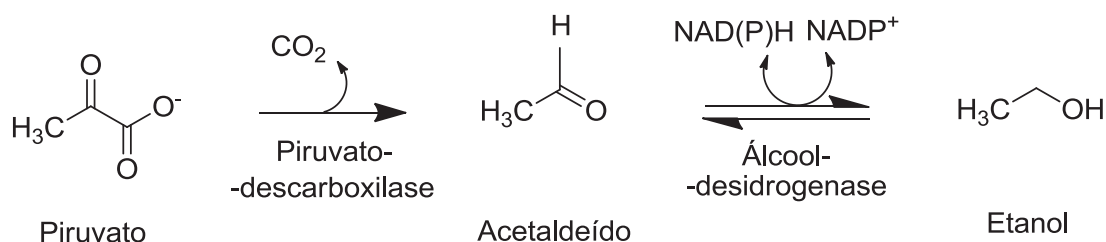
|                     | <b>Etapas</b> | <b>Enzima</b>                            | <b>Produto</b>                                      |
|---------------------|---------------|--|---|
| <b>Investimento</b> | 1             | hexoquinase                              | glucose-6-fosfato                                   |
|                     | 2             | fosfo-hexose-isomerase                   | frutose-6-fosfato                                   |
|                     | 3             | fosfofrutoquinase                        | frutose-1,6-bifosfato                               |
|                     | 4             | frutose-1,6-bifosfato-aldolase           | diidroxiketona fosfato<br>+ gliceraldeído-3-fosfato |
|                     | 5             | triose-fosfato-isomerase                 | gliceraldeído-3-fosfato                             |
| <b>Pagamento</b>    | 6             | gliceraldeído-3-fosfato<br>desidrogenase | 1,3-bifosfoglicerato + 2<br>NADH                    |
|                     | 7             | fosfoglicerato-quinase                   | 2 ATPs + 3-fosfoglicerato                           |
|                     | 8             | fosfoglicerato-mutase                    | 2-fosfoglicerato                                    |
|                     | 9             | enolase                                  | fosfoenolpiruvato                                   |
|                     | 10            | piruvato-quinase                         | piruvato + 2 ATP                                    |

A fase de pagamento inicia-se pela etapa 6 com a oxidação do gliceraldeído 3-fosfato pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em reação reversível. No próximo passo 7, há a produção de ATP pela fosforilação de ADP e a conversão do 1,3-bifosfoglicerato em 3-fosfoglicerato pela fosfoglicerato-quinase, seguida de rearranjo (8) no qual o fosfato passa do C3 para o C2, formando então o 2-fosfoglicerato. A etapa 9 promove a desidratação do 2-fosfoglicerato pela enolase, formando o fosfoenolpiruvato, e, por fim 10, o fosfoenolpiruvato transfere o grupo



fosfato para um ADP através da enzima piruvato-quinase em reação irreversível, formando piruvato e ATP. Assim dá-se o pagamento dos 2 ATP empregados na fase de investimento.

O estágio seguinte é a conversão do piruvato em etanol e CO<sub>2</sub>, onde primeiramente ocorre a descarboxilação do piruvato catalisada pela piruvato descarboxilase em uma reação irreversível originando acetaldeído. Finalmente, com a ação da álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol (**Figura 13**).



**Figura 13.** Síntese de etanol a partir do piruvato empregando a enzima álcool desidrogenase (Adaptado de Eran e Ma, 2013).

O microrganismo mais utilizado para este processo é uma levedura denominada *Saccharomyces cerevisiae*, que tem aplicação industrial por fermentar hexoses eficientemente, resultando em altas produções de etanol. Este microrganismo apresenta atividade ótima em pH 4,5 e 37 °C, entretanto, seu metabolismo não é capaz de fermentar pentoses como a xilose, o principal constituinte da fração hemicelulósica da biomassa (Santos et al., 2010; Yuan et al., 2011).

A fermentação pode ser integrada com outras etapas do processo de várias formas, como SHF, SSF, CF, SSCF e CBP conforme indicado na **Figura 1**, no entanto, os processos de SHF e SSF são os mais estudados. A principal vantagem do SHF é permitir que os processos de hidrólise enzimática e fermentação ocorram em suas condições ótimas (Santos et al., 2010). Entretanto, o processo SSF reduz o tempo de processamento, pois a glucose liberada por hidrólise é rapidamente convertida a etanol pela levedura, reduzindo a inibição das celulasas pelo acúmulo dos produtos de hidrólise (Watanabe et al., 2010).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a produção de etanol celulósico a partir de *Eucalyptus urograndis* explodido a vapor e avaliar o efeito da deslignificação alcalina sobre os rendimentos do processo, buscando estabelecer um estudo comparativo em relação ao comportamento do bagaço de cana-de-açúcar.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as melhores condições de pré-tratamento por explosão a vapor de cavacos de *Eucalyptus urograndis* utilizando planejamento fatorial;
- Avaliar o efeito da deslignificação alcalina dos cavacos de eucalipto com e sem auxílio do ultrassom;
- Caracterizar quimicamente as frações derivadas do pré-tratamento e determinar o balanço de massa dos principais componentes da biomassa;
- Investigar a susceptibilidade à hidrólise enzimática de todos os substratos celulósicos obtidos;
- Analisar comparativamente a produção de etanol a partir dos substratos produzidos empregando alto teor de sólidos totais e fermentação com diferentes leveduras;
- Comparar o desempenho de *E. urograndis* em sua condição de melhor rendimento com resultado obtido a partir do bagaço de cana pré-tratado a vapor.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAIS

Os cavacos de *Eucalyptus urograndis* foram obtidos junto à EMBRAPA-Florestas (Colombo, PR), enquanto que o bagaço de cana-de-açúcar foi obtido junto ao Centro de Tecnologia Canavieira - CTC (Piracicaba, SP). As preparações enzimáticas empregadas para a sacarificação dos substratos pré-tratados foram as Cellic CTec2 e Cellic CTec3, ambas fornecidas pela Novozymes Latin América (Araucária, PR). As leveduras utilizadas nos ensaios de fermentação foram as Thermossac<sup>®</sup> Dry e CAT-1, ambas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo a primeira fornecida pela empresa Lallemand Specialties Inc. (Milwaukee, EUA) e a segunda cedida pela LNF Latino América (Bento Gonçalves, RS).

Os demais reagentes e solventes orgânicos foram adquiridos no mercado em especificação para análise e não sofreram nenhum tipo de tratamento antes de sua utilização. Padrões e solventes para análise cromatográfica foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

### 4.2 MÉTODOS

Serão apresentadas neste capítulo as metodologias empregadas na caracterização de materiais *in natura* e substratos pré-tratados, assim como os procedimentos experimentais que foram adotados para os pré-tratamentos e posterior verificação da susceptibilidade à hidrólise enzimática e fermentação dos hidrolisados produzidos nas condições experimentais de melhor desempenho. A estratégia de ação utilizada neste trabalho está apresentada na **Figura 14**.

#### 4.2.1 Análise química dos materiais celulósicos

A caracterização inicial dos substratos foi realizada na UFPR segundo as normas do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) conforme indicado na **Tabela 3**. Ensaios complementares como a análise de oligômeros hidrossolúveis, a determinação de carboidratos por metanólise e a determinação de massas molares, polidispersidade e grau de polimerização dos substratos foram realizados estágio sanduíche no Grupo *Biopolymer Analytics da Universität für Bodenkultur* (BOKU) em Viena (Áustria), sob supervisão da Prof Antje Potthast



**Figura 14.** Estratégia de ação empregada para o desenvolvimento deste trabalho (PT = pré-tratamento; US = ultrassom).

**Tabela 3.** Caracterização química dos substratos celulósicos com suas respectivas normas.

| Análises          | Descrição                | Norma             |
|-------------------|--------------------------|-------------------|
| Extraíveis        | Extração água e etanol   | NREL/TP-510-42619 |
| Umidade           | Balança de infravermelho | NREL/TP-510-42621 |
| Cinzas            | Gravimetria              | NREL/TP-510-42622 |
| Carboidratos      | HPLC                     | NREL/TP-510-42618 |
| Lignina Insolúvel | Gravimetria              | NREL/TP-510-42618 |
| Lignina Solúvel   | Ultravioleta             | NREL/TP-510-42617 |

#### 4.2.1.1 Determinação teor de extraíveis

Cavacos de *E. urograndis*, previamente moídos em moinho de facas do tipo Wiley (60 mesh), foram submetidos a uma extração com etanol em aparelho Soxhlet por 16 h e o material extraído foi seco a 40 °C. As extrações foram realizadas em

triplicata utilizando cerca de 3,5 g de material (massa seca), seguindo a norma NREL/TP-510-42619 (Sluiter et al., 2008a).

No caso de bagaço de cana-de-açúcar, cerca de 2 g de material (massa seca) previamente moído também foi submetido a uma extração aquosa em Soxhlet em duplicata. Posteriormente, o material foi seco a 40 °C para ser então submetido a uma extração em Soxhlet utilizando etanol por 18 h (norma NREL/TP-510-42619) (Sluiter et al., 2008a).

Tanto os extraíveis do eucalipto quanto os de bagaço de cana foram secos com o auxílio de um evaporador rotativo modelo IKA RV10 Digital e os seus rendimentos mássicos foram determinados por gravimetria em relação à massa seca do material de origem.

#### *4.2.1.2 Determinação de massa seca e cinzas*

A determinação da umidade dos materiais lignocelulósicos foi realizada em balança de infravermelho (Shimadzu Modelo MOC63u) de acordo com a norma NREL/TP-510-42621 (Sluiter et al., 2008b). Já os teores de cinzas foram determinados por gravimetria em mufla Quimis Modelo Q-318S24 a 575 °C segundo a norma NREL/TP-510-42622 (Sluiter et al., 2008c).

#### *4.2.1.3 Determinação de carboidratos e lignina*

As composições químicas dos materiais celulósicos livres de extraíveis e dos substratos pré-tratados foram determinadas de acordo com os métodos NREL/TP-510-42618 (Sluiter et al., 2012) e NREL/TP-510-42617 (Hyman et al., 2008), gerando teores de lignina insolúvel em meio ácido (determinado por gravimetria), de lignina solúvel em meio ácido (determinado por espectroscopia no ultravioleta) e carboidratos (determinado por cromatografia a líquido). Estes métodos consistem na hidrólise de aproximadamente 0,3 g de amostra empregando 3 mL de ácido sulfúrico 72% a 30 °C por 1 h, com agitação constante utilizando um bastão de vidro. Em seguida, foi realizada uma diluição do material com 84 mL de água destilada e o conjunto foi tratado em autoclave a 121 °C por 1 h. O material resultante foi filtrado e a massa retida no cadinho de Gooch foi quantificada, enquanto que o filtrado foi analisado por espectrometria no ultravioleta da marca/modelo Carry 100 Scan no

comprimento de onda de 240 nm para determinação da lignina solúvel em ácido (LSA) foi realizada de acordo com a **Equação 1**.

$$LSA\% = \frac{UV_{Abs} \times Volume_{filtrado} \times Diluição}{\epsilon \times m_{seca}} \quad \text{(Equação 1)}$$

Já a composição em carboidratos foi determinada no hidrolisado deste procedimento usando Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (HPLC do inglês *High performance liquid chromatography*). O equipamento utilizado, da marca Shimadzu, consiste de um sistema de deslocamento positivo de alta pressão LC-20, degaseificador de fase móvel DGU-14A, amostrador automático SIL-10AF, modo de controle CBM-20A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO-10A e dois sistemas de detecção, um por espectrometria no ultravioleta com rede de fotodiodos (UV-DAD) M-10A e outro por refratometria diferencial RID-10A. A coluna utilizada foi a Agilent Hi-Plex H (Califórnia, USA) a 65 °C, precedida por pré-coluna Cátion-H e eluída com fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mmol L<sup>-1</sup> a uma vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>. A quantificação foi efetuada por padronização externa com curvas de calibração construídas para cada componente de interesse, onde as faixas de concentração de cada analito foram de 0,1 até 1 g L<sup>-1</sup> para celobiose, glucose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural.

#### 4.2.1.4 Análise dos oligômeros da fração solúvel

Com o objetivo de analisar a presença de oligossacarídeos na fração solúvel derivada do pré-tratamento, 10 mg de amostra foram acetiladas em 1 mL de piridina anidra com 1 mL de anidrido acético e 100 µL de solução de dimetilaminopiridina (DMAP - 1 mg mL<sup>-1</sup> de piridina). Após agitação em Vortex, a mistura reacional foi aquecida a 60 °C por 2 h. Posteriormente, a piridina foi eliminada por extração líquido/líquido, empregando 1,5 mL de clorofórmio e 2 mL de solução de sulfato de cobre (10 % m v<sup>-1</sup>). Após centrifugação por 2 min e separação de fases, o sobrenadante foi retirado e adicionado nova solução de sulfato de cobre. Este procedimento foi repetido 5 vezes e finalmente, o clorofórmio foi evaporado em capela durante a noite para recuperação dos oligossacarídeos acetilados.

Após a acetilação das amostras empregou-se a técnica de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC do inglês *high-performance thin layer chromatography*) usando equipamento da CAMAG (Muttenez, Switzerland): com amostrador automático ATS4, cuba cromatográfica automática ADC2, câmara de revelação TLC Visualizer e Scanner 3, com o software VisionCats 2.4. As amostras foram aplicadas em placas comerciais de cromatografia em camada delgada (TLC do inglês *thin layer chromatography*) TLC Silicagel 60G F254 de vidro (20 x 20 cm), previamente lavadas com metanol e, foram eluídas com acetato de etila:tolueno em razão volumétrica 7:3.

A visualização das bandas de eluição foi realizada empregando anisaldeído/ácido sulfúrico. O reagente foi preparado a partir da adição 170 mL de metanol em 20 mL de ácido acético. Após 30 min em freezer a -80 °C, adicionou-se 10 mL de ácido sulfúrico sob agitação, para então ser adicionado 1 mL de 4-metoxibenzaldeído a esta solução. A placa de TLC foi imersa no reagente derivatizante por 1 s e depois aquecida a 120 °C por 2-5 min e levada para câmara de revelação com detecção a 366 nm.

#### 4.2.1.5 Determinação dos carboidratos por metanólise ácida

Para uma caracterização mais detalhada dos carboidratos presente na fração hemicelulósica das amostras, cerca de 5 mg (massa seca) foram submetidos à metanólise ácida pela adição de 2 mL de HCl/metanol 2 mol L<sup>-1</sup> em tubos de centrífuga que foram levados ao forno durante 5 h a 100 °C, com agitação em Vortex a cada 30 min. Depois que as amostras foram resfriada até a temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de piridina anidra e 100 µL de solução padrão de sorbitol (5 mg mL<sup>-1</sup> de metanol). A evaporação da piridina e do metanol foi realizada sob fluxo de nitrogênio e as amostras foram deixadas em freezer durante a noite para serem posteriormente liofilizadas em equipamento LABCONCO por no mínimo 24 h.

O passo de derivatização foi realizado com a adição de 200 µL de piridina anidra, seguido de 1 h de incubação na temperatura ambiente sem agitação. Depois adicionou-se 200 µL de piridina anidra contendo 1,5 mg de dimetilaminopiridina (DMAP) mL<sup>-1</sup> de piridina e 400 µL de N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 10% de trimetilclorosilano (TMCS). A reação se deu a 70 °C por 2 h. Posteriormente, as amostras resfriadas receberam 400 µL de acetato de etila. A



mistura foi centrifugada por 5 min e o sobrenadante foi analisado por cromatografia a gás (CG) (Sundberg et al., 1996).

A análise de CG foi realizada em sistema Agilent (Mississauga, ON, Canadá) modelo 7890B acoplado com um detector de ionização em chama (GC-FID), com volume de injeção de 1  $\mu\text{L}$  e razão de divisão de amostra de 10:1, coluna de metil siloxano HP1 (30 m  $\times$  0,32 mm; 0,25  $\mu\text{m}$ ) e hidrogênio como gás de arraste a uma vazão de 2  $\text{mL min}^{-1}$ . A temperatura inicial de análise foi de 140  $^{\circ}\text{C}$  por 1 min, seguida de aquecimento com taxa de 4  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 210  $^{\circ}\text{C}$ , depois 30  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 260  $^{\circ}\text{C}$  e isoterma de 5 min até a conclusão da corrida. A temperatura do injetor e do detector foram mantidas em 260 e 280  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, enquanto que o FID foi mantido em 320  $^{\circ}\text{C}$  com vazão de  $\text{H}_2$  a 30  $\text{mL min}^{-1}$ . A quantificação foi efetuada por padronização externa empregando soluções de referência dos seguintes componentes: arabinose, ramnose, fucose, xilose, ácido galacturônico, ácido 4-O-metil-glucurônico, manose, galactose, glucose e ácido glucurônico.

#### *4.2.1.6 Determinação de massas molares, polidispersidade e grau de polimerização dos substratos pré-tratados*

Para a análise da distribuição de massas molares, polidispersidade e grau de polimerização dos substratos, cerca de 15-20 mg de amostra seca foi suspensa em 200 mL de água e esse material foi homogeneizado em liquidificador de vidro na velocidade máxima do equipamento por 1-3 min. Após a filtração em funil de Büchner com papel de filtro de 55 mm de diâmetro, foi realizado um passo de designificação com 1 mL de clorito de sódio ( $\text{NaClO}_2$ ) 1  $\text{mol L}^{-1}$  em 1 mL de tampão acetato de sódio 0,4  $\text{mol L}^{-1}$  durante 24 h a 40  $^{\circ}\text{C}$ . O pH da mistura foi ajustado em 6 com uma solução diluída de ácido acético.

Após essa etapa de designificação, as amostras foram filtradas e lavadas para seguir com a troca de solvente, que é feita para eliminação da água presente no filtrado usando 4 mL de dimetilacetamida (DMAc) sob agitação em temperatura ambiente por no mínimo 12 h. A DMAc foi removida por centrifugação e para a dissolução da amostra foi adicionado 1 mL DMAc/LiCl 9% sob agitação na temperatura ambiente por no mínimo 24 h.

O preparo de amostra foi realizado com 0,3 mL de amostra e 0,9 mL de DMAc para diluição. Após agitação em vortex as amostras diluídas foram filtradas

em filtro 0,45  $\mu\text{m}$  e levadas para análise em cromatografia de permeação em gel (GPC do inglês *gel permeation chromatography*). As amostras (100  $\mu\text{L}$ ) foram então injetadas com auxílio de um amostrador automático (HP100) em 4 colunas de GPC em série (PLgel MIXED A LS, 20  $\mu\text{m}$ , 7.5 x 300 mm - Agilent), tendo como fase móvel DMAc/LiCl (0,9 % m/V) filtrado em 0,02  $\mu\text{m}$  em vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . O sinal foi monitorado por detector de espalhamento de luz de multi-ângulo (MALLS do inglês *multi-angle laser light scattering* - Wyatt Dawn Heleos II) com feixe de laser de argônio ( $\lambda_0 = 488 \text{ nm}$ , Dawn DSP;  $\lambda_0 = 658 \text{ nm}$ , Dawn Heleos) e por índice de refração (RI - Shodex RI-71). O sistema analítico contava com um desgaseificador (Dionex DG-2410), um sistema de deslocamento positivo Kontron 420 e um amortizador de pulso.

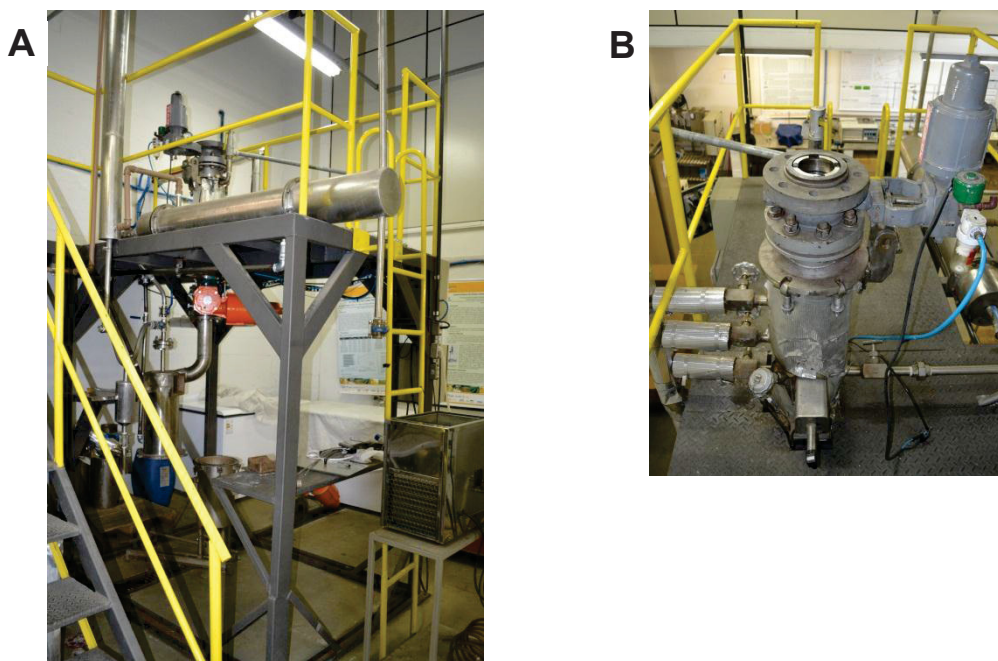
A distribuição de massas molares e outros parâmetros foram calculadas no software Astra com base em um índice de refração  $dn/dc$  de 0,136  $\text{mL g}^{-1}$  para celulose em DMAc/LiCl (0,9 % m/V) a 25 °C (Röhring et al., 2002a; Röhring et al., 2002b). O desvio padrão para as massas molares médias ( $MM_N$ ,  $MM_W$ ) foi de cerca de 5-10%. Padrões de poliestireno monodisperso foram usados para a normalização do MALLS assim como para cálculo do volume morto dos detectores.

## 4.2.2 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

### 4.2.2.1 Pré-tratamento por explosão a vapor (auto-hidrólise)

O pré-tratamento por explosão a vapor foi realizado em um reator de aço inox com capacidade para 10 L, provido de sensores para controle da temperatura e tempo de reação (**Figura 15**). A pressão foi controlada na entrada principal do vapor, cuja injeção era dividida em 3 (três) vias, todas providas de válvulas de alta pressão, o que proporciona uma melhor eficiência térmica e, portanto, maior homogeneidade durante o pré-tratamento. O reator estava acoplado a uma caldeira geradora de vapor, a um compressor de ar e a um ciclone, que foi empregado para a descarga do material e escape de vapores.

Para cada condição de tempo e temperatura de explosão a vapor, calculou-se o fator de severidade expresso em  $\log R_0$  a partir da **Equação 2**, onde  $T$  (°C) é a temperatura e  $t$  (min) é o tempo de residência do material no reator (Overend e Chornet, 1987).

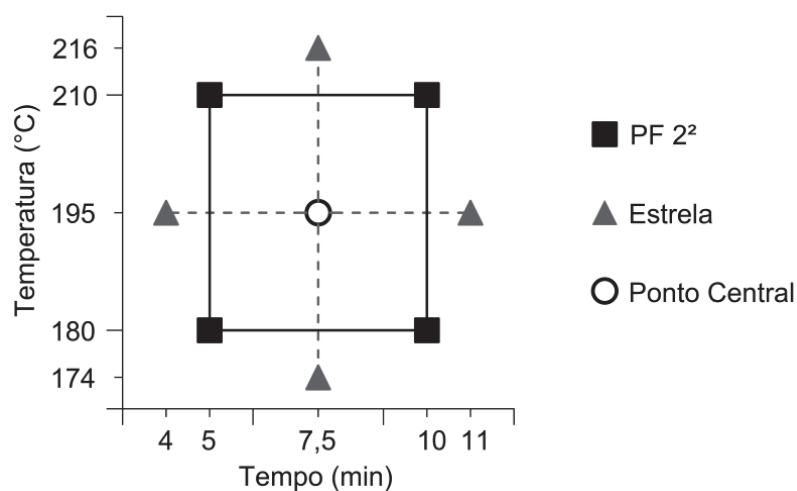


**Figura 15.** Imagens do (A) reator de explosão a vapor e da (B) válvulas de esfera localizada na sua parte superior que se encontram instaladas no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) da UFPR.

A explosão a vapor de cavacos industriais de *E. urograndis* foi realizada na ausência de um catalisador ácido exógeno, processo este também chamado de auto-hidrólise, variando o fator de severidade entre 3,05 e 4,29. Para isto, seguiu-se um planejamento  $2^2$  com pontos axiais (**Figura 16**) com triplicata no ponto central e as variáveis foram temperatura e o tempo de reação cujos valores ficaram entre 174 a 216 °C e entre 4 e 11 min, respectivamente (**Tabela 4**). Além do tempo de cozimento em temperatura constante, o tempo de aquecimento para alcançar se a temperatura desejada no reator foi 45 s em média.

$$\log R_O = e^{\left(\frac{T-100}{14,75}\right)} \cdot t \quad (\text{Equação 2})$$

Os experimentos de explosão a vapor do bagaço de cana foram realizados sob condições previamente otimizadas. Tais condições correspondem a um  $\log R_O$  de 3,67, empregando 195 °C por um tempo de residência de 7,5 min (Pitarelo et al., 2016).



**Figura 16.** Representação gráfica do planejamento fatorial (PF)  $2^2$  com projeção em axial, indicando as condições de tempo e temperatura definidas no delineamento.

**Tabela 4.** Condições empregadas no pré-tratamento por explosão a vapor de *E. urograndis* e seus respectivos fatores de severidade ( $\log R_0$ ).

| Experimentos        |       | Condições |         | $\log R_0$ |
|---------------------|-------|-----------|---------|------------|
|                     |       | T (°C)    | t (min) |            |
| Ponto central (PC)  | EAH1  | 195       | 7,5     | 3,67       |
|                     | EAH2  | 195       | 7,5     | 3,67       |
|                     | EAH3  | 195       | 7,5     | 3,67       |
| Pontos dos vértices | EAH4  | 180       | 5       | 3,05       |
|                     | EAH5  | 180       | 10      | 3,36       |
|                     | EAH6  | 210       | 5       | 3,94       |
|                     | EAH7  | 210       | 10      | 4,24       |
| Pontos axiais       | EAH8  | 174       | 7,5     | 3,05       |
|                     | EAH9  | 195       | 4       | 3,39       |
|                     | EAH10 | 195       | 11      | 3,84       |
|                     | EAH11 | 216       | 7,5     | 4,29       |

Após o pré-tratamento, os materiais pré-tratados foram lavados com água para remoção dos componentes liberados por hidrólise ácida. Esta lavagem foi realizada a 5% de sólidos totais sob agitação por 1 h na temperatura ambiente. O rendimento dos substratos celulósicos resultantes foi determinado em relação à

massa seca do material de origem. Os cálculos de rendimento mássico foram obtidos por diferença de massas a partir da recuperação da fração insolúvel.

#### 4.2.2.2 *Pré-tratamento por deslignificação alcalina*

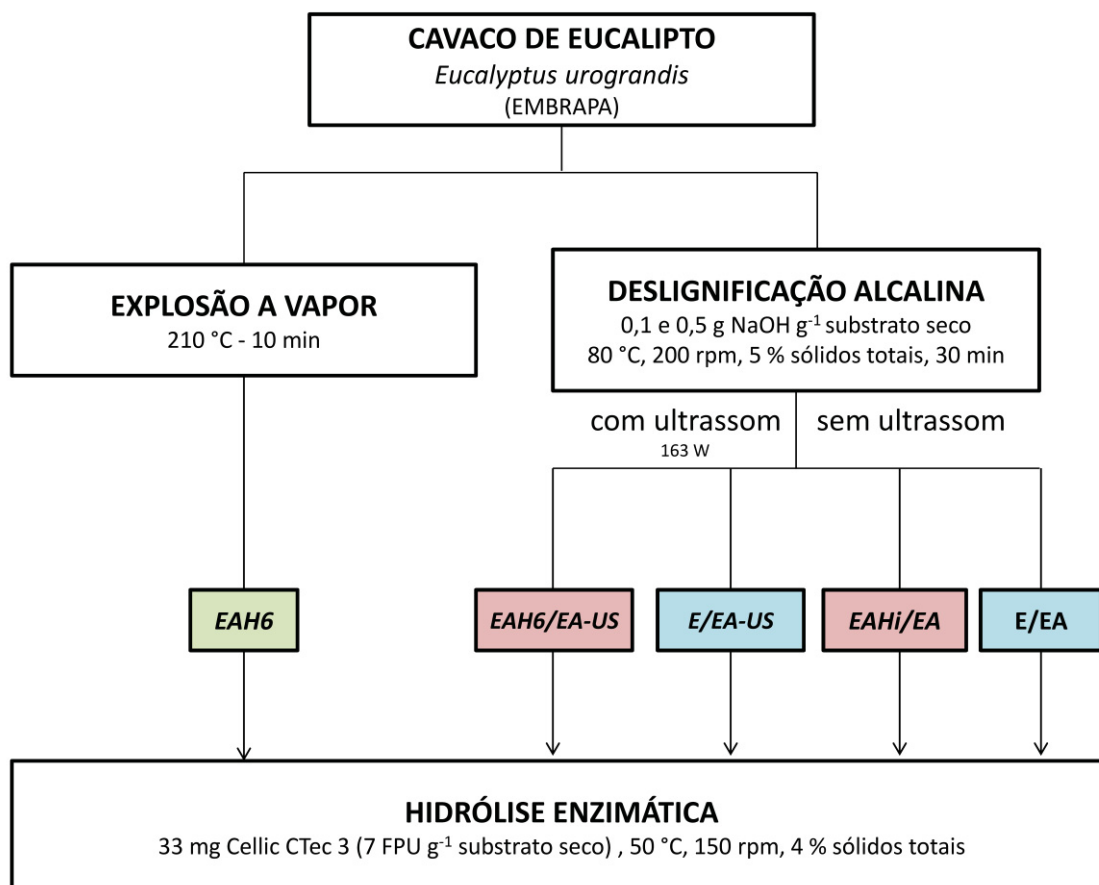
Os experimentos de deslignificação foram realizados em soluções alcalinas (0,1 e 0,5 g NaOH g<sup>-1</sup> substrato seco) com 5 % de sólidos totais, em frascos Erlenmeyer de 500 mL adaptado a um banho de ultrassom Ultrasonic, modelo Q5.9/37A. A agitação foi de 200 rpm por 30 min e a potência do ultrassom, quando acionada, foi de 163 W. Após a realização das extrações, as amostras foram filtradas e lavadas com solução de NaOH na mesma concentração utilizada para a extração e, na sequência, submetidas à lavagens com água até que o substrato apresentasse pH neutro. O rendimento dos substratos resultantes foi determinado em relação à massa seca do material antes do pré-tratamento. Os cálculos de rendimento mássico foram obtidos por diferença de massas a partir da recuperação da fração insolúvel após o pré-tratamento. As siglas do fluxograma da **Figura 17** foram propostas de acordo com o tipo pré-tratamento empregado. Para o eucalipto, o material que foi explodido a vapor recebeu a sigla *EAH6* (eucalipto auto-hidrolisado), os materiais que foram diretamente deslignificados foram nomeados *E/EA-US* e *E/EA* (eucalipto extraído com álcali com e sem auxílio do ultrassom) e, por fim, os materiais que tiveram o pré-tratamento combinado foram chamados de *EAH6/EA-US* e *EAH6/EA* (eucalipto auto-hidrolisado e extraído com álcali com e sem auxílio do ultrassom), sendo todos seguidos do valor de NaOH em g usados na extração (0,1 ou 0,5).

#### 4.2.3 **Hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados**

##### 4.2.3.1 *Hidrólise enzimática com baixo teor de sólidos totais*

A hidrólise dos materiais pré-tratados, deslignificados ou não, foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL com volume final de 100 mL, 4% de sólidos totais e 33 mg de Cellic CTec2 ou CTec3 g<sup>-1</sup> material seco em tampão acetato 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 4,8 ou 5,2, respectivamente. As reações foram realizadas em uma incubadora de agitação orbital Ecotron (Bottmingen, Switzerland) por 96 h a 50 °C e 150 rpm. Para análise cromatográfica, alíquotas (0,5 mL) foram retiradas nos tempos de 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h e estas foram fervidas por 5 min e

centrifugadas. Os componentes monitorados por HPLC foram celobiose e glucose, sendo expressos em relação aos seus polissacarídeos de origem através da multiplicação por seus respectivos fatores de hidrólise. Os rendimentos de hidrólise foram expressos em equivalentes de glucose ( $[EqGlc] = [glucose] + [celobiose] \times 1,0526$ ) e calculados em relação à quantidade de glucanas presente nos substratos pré-tratados. A determinação da atividade celulásica total foi realizada segundo o método desenvolvido por Ghose (1987) e adaptado por Schwald et al. (1998). Essa adaptação sugere o uso de tiras de  $70 \pm 0,5$  mg de papel de filtro Whatman #1 com 1 cm de largura e o uso de um volume total de reação de 2 mL



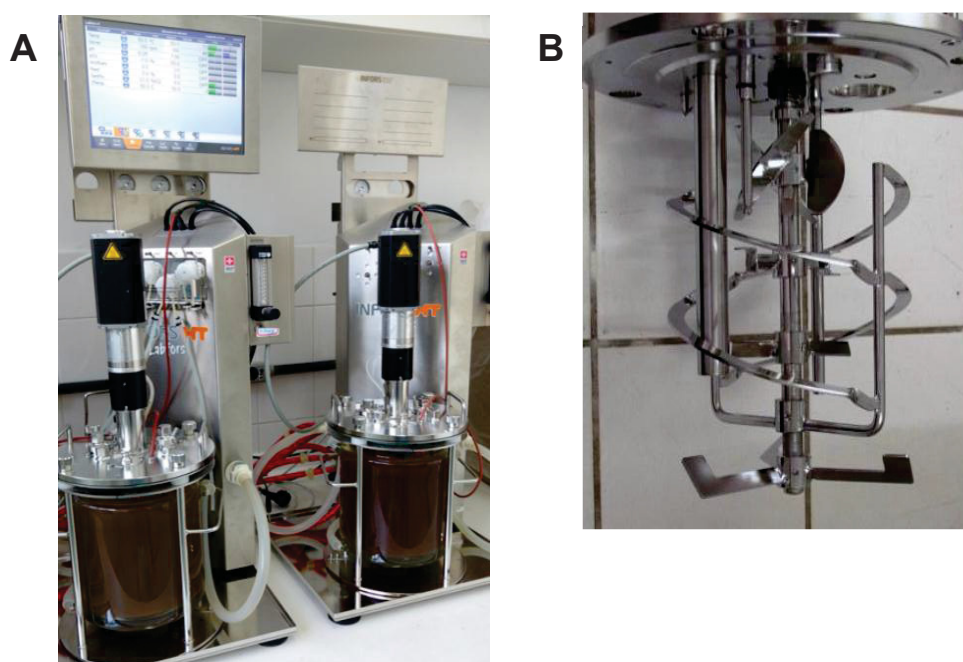
E = eucalipto; AH6 = explosão a vapor (auto-hidrólise) a 210 °C por 5 min (EAH6), EA = extração alcalina; US = ultrassom; AHx = auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura;

**Figura 17.** Fluxograma da metodologia empregada para os pré-tratamentos de cavacos de eucalipto com suas respectivas abreviações.



#### 4.2.3.2 Hidrólise enzimática com alto teor de sólidos totais

As hidrólises enzimáticas em alta teor de sólidos totais dos materiais pré-tratados foram realizadas em reator Infors-HT Modelo Labfors 5 BioEtOH (**Figura 18A**) sob agitação múltipla (**Figura 18B**) durante 72 h a 50 °C e 150 rpm, empregando 62,5 mg de Cellic CTec2 ou CTec3 g<sup>-1</sup> material seco em tampão acetato 50 mol L<sup>-1</sup> em pH 4,8 ou 5,2, respectivamente (Pitarelo et al., 2012). Estas enzimas foram empregadas para avaliação comparativa dos seus respectivos desempenhos.



**Figura 18.** Reator Infors-HT Labfors 5 BioEtOH (**A**), com capacidade total de 3,6 L, e (**B**) sistema de agitação múltipla, composta por vários impelidores sequenciais: uma hélice naval com *downflow*, quebradores de viscosidade, um impelidor helicoidal e, por último, um impelidor de fundo.

A alimentação do substrato no reator foi realizada em quatro etapas, sendo 5 % a cada 1,5 h de reação, chegando então em 20 % de sólidos totais em 4,5 h para um volume final de 2,5 L. Alíquotas de aproximadamente 2 mL foram retiradas nos tempos de 6, 12, 24, 48, 72 h e mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado para análise de celobiose, glucose e xilose.



#### 4.2.4 Ensaios de fermentação

O meio de cultura utilizado apresentou a seguinte composição: 1,0 % (m v<sup>-1</sup>) de glucose, 0,5 % (m v<sup>-1</sup>) de peptona, 0,3 % (m v<sup>-1</sup>) de extrato de levedura, 0,3 % de extrato de malte e 2 % (m v<sup>-1</sup>) de ágar em água deionizada. Estes componentes foram dissolvidos por aquecimento até a fervura e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min. Posteriormente, o meio foi distribuído em placas de Petri esterilizadas no interior de uma capela de fluxo laminar e estas foram então armazenadas em câmara fria para uso posterior.

A preparação do pré-inóculo foi realizada em meio contendo 100 mL de meio de crescimento composto por: 30 g L<sup>-1</sup> de glucose, 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 2 g L<sup>-1</sup> de cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl), 1 g L<sup>-1</sup> de fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e 0,3 g L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio em água. As culturas foram incubadas a 37 °C sob agitação orbital de 150 rpm por aproximadamente 24 h. O acompanhamento do crescimento celular foi realizado pela leitura da densidade óptica do sobrenadante a 640 nm (DO640) em espectrofotômetro Varian, modelo Cary 100 (Palo Alto, USA). Para os ensaios de fermentação, a medida da DO640 foi realizada no meio de crescimento após 24 h de incubação, que foi posteriormente centrifugado em tubos esterilizados para remoção do sobrenadante.

Os experimentos de fermentação foram realizados em duplicata utilizando o hidrolisado obtido pela ação das enzimas sob os substratos pré-tratados por explosão a vapor, sendo que o meio continha 20 mL de hidrolisado em tampão acetato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 4,8), 1,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 0,5 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,025 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 1,0 g L<sup>-1</sup> de levedura. Os ensaios foram realizados em uma incubadora de agitação orbital a 35 °C e 150 rpm por 24 h, sendo que alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 3, 6, 12, 20 e 24 h para análise.

O consumo de glucose e a produção de etanol foram quantificados por HPLC como descrito anteriormente, empregando padronização externa. Os cálculos realizados para avaliação dos resultados de fermentação foram: eficiência em relação à produção de etanol e à concentração de glucose inicial (**Equação 3**) e, produtividade a partir da relação entre a produção de etanol e o tempo do ensaio (**Equação 4**).

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{([glucose\ inicial] * 0,51)}{[etanol\ final]} * 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

$$\text{Produtividade (g L}^{-1}\text{ h}^{-1}\text{)} = \frac{[\text{etanol final}]}{\text{tempo de ensaio}} \quad \text{(Equação 4)}$$

#### 4.2.5 Tratamento estatístico

Para avaliar o significado estatístico dos resultados, realizou-se o teste t de Student empregando o programa Excel 2010 – Ferramenta Análise de Dados. Os valores de t calculado ( $t_{\text{cal}}$ ) foram gerados para um grau de confiança de 95% e esses foram então comparados aos valores de t crítico ( $t_{\text{cri}}$ ). Neste caso, se  $t_{\text{cal}}$  for maior que  $t_{\text{cri}}$ , os dados devem ser considerados estatisticamente diferentes.

Os dados obtidos no planejamento fatorial foram avaliados a partir da modelagem das variáveis empregadas no delineamento experimental utilizando o software Statistica 8.0. Desta forma, foi possível realizar a análise de variância (ANOVA) e gerar as superfícies de resposta para corroborar as tendências observadas com os dados experimentais. Ainda, a partir dos efeitos estatísticos calculados em cada tempo de hidrólise para cada condição de pré-tratamento, foram analisados os efeitos de primeira e segunda ordem sobre a conversão da celulose a equivalentes de glucose, a partir da construção de um gráfico de Pareto.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

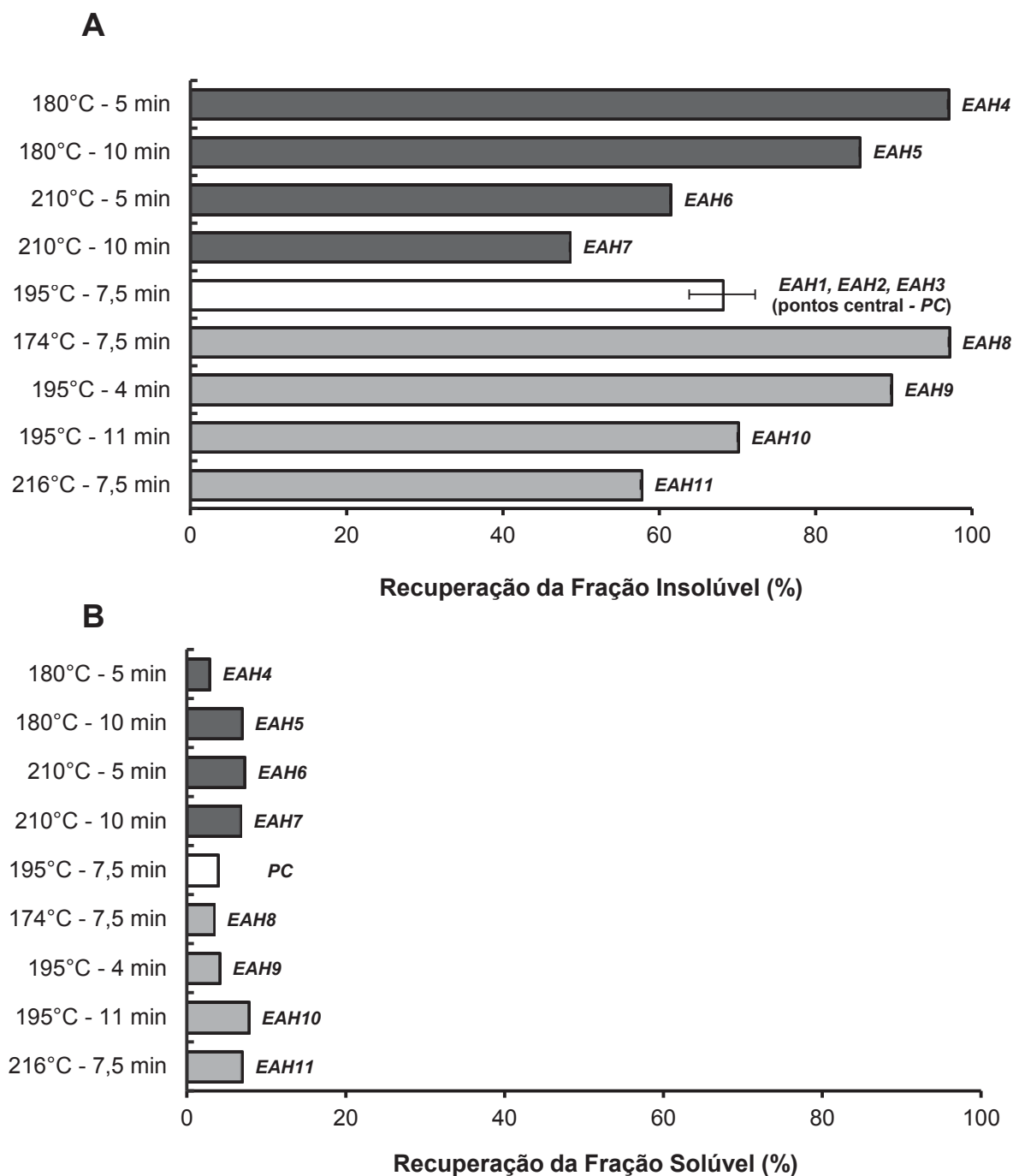
### 5.1 PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE *Eucalyptus urograndis*

Os dados de investigação do pré-tratamento por explosão a vapor de cavacos de eucalipto foram planejados como um delineamento fatorial para que os efeitos das variáveis tempo e temperatura pudessem ser avaliados. No entanto, essa estratégia foi aplicada apenas para os valores de conversão obtidos após hidrólise enzimática dos substratos celulósicos por 96 h de reação, caracterizando assim o uso de procedimentos SHF para a produção de etanol celulósico. Por uma questão de simplicidade, a análise dos demais resultados foi realizada em relação ao fator de severidade, que reduz o espaço amostral a um sistema univariado.

#### 5.1.1 Pré-tratamento por explosão a vapor

Inicialmente, foi necessário desenvolver um estudo sistemático para identificar as melhores condições de tempo e temperatura para o pré-tratamento por explosão de cavacos industriais de *E. urograndis*, visando obter os melhores rendimentos de recuperação e o melhor substrato para a hidrólise enzimática. As condições empregadas na auto-hidrólise, com suas respectivas abreviaturas e os rendimentos obtidos em relação às frações insolúveis e solúveis em água, estão apresentados na **Figura 19**.

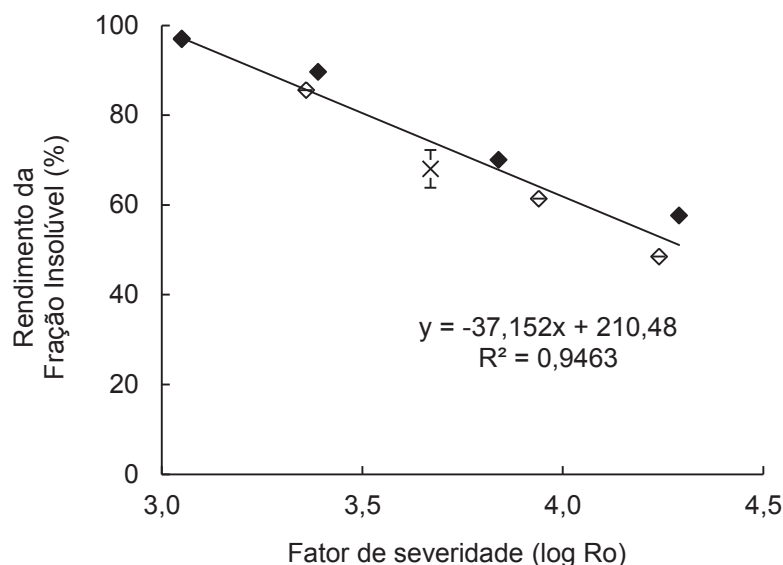
No caso da fração insolúvel, observa-se que o aumento da drasticidade do pré-tratamento resultou em diminuição do rendimento de sua recuperação. Por consequência, o teor de sólidos totais no caso da fração solúvel aumentou com o aumento da severidade. Da somatória entre esses dois rendimentos de recuperação, fica evidente que houve uma perda de massas que dependeu da drasticidade do pré-tratamento e isso se deve à volatilização de componentes de baixa massa molar durante o processo de descompressão do reator para coleta do material pré-tratado. Martin-Sampedro et al. (2014) obtiveram recuperações semelhantes da fração insolúvel derivada de *E. globulus* por explosão a vapor, que variaram de 84 a 93 % para fatores de severidade de 3,35 a 3,56. Por outro lado, Nunes e Pourquie (1996), também investigando a explosão a vapor de *E. globulus*, obtiveram perdas de material em torno de 10 % para fatores de severidade variando entre 3,18 e 3,76.



**Figura 19.** Recuperação de sólidos totais das frações (A) insolúvel e (B) solúvel em água derivadas da explosão a vapor de *E. urograndis* sob diferentes condições de auto-hidrólise (EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura).

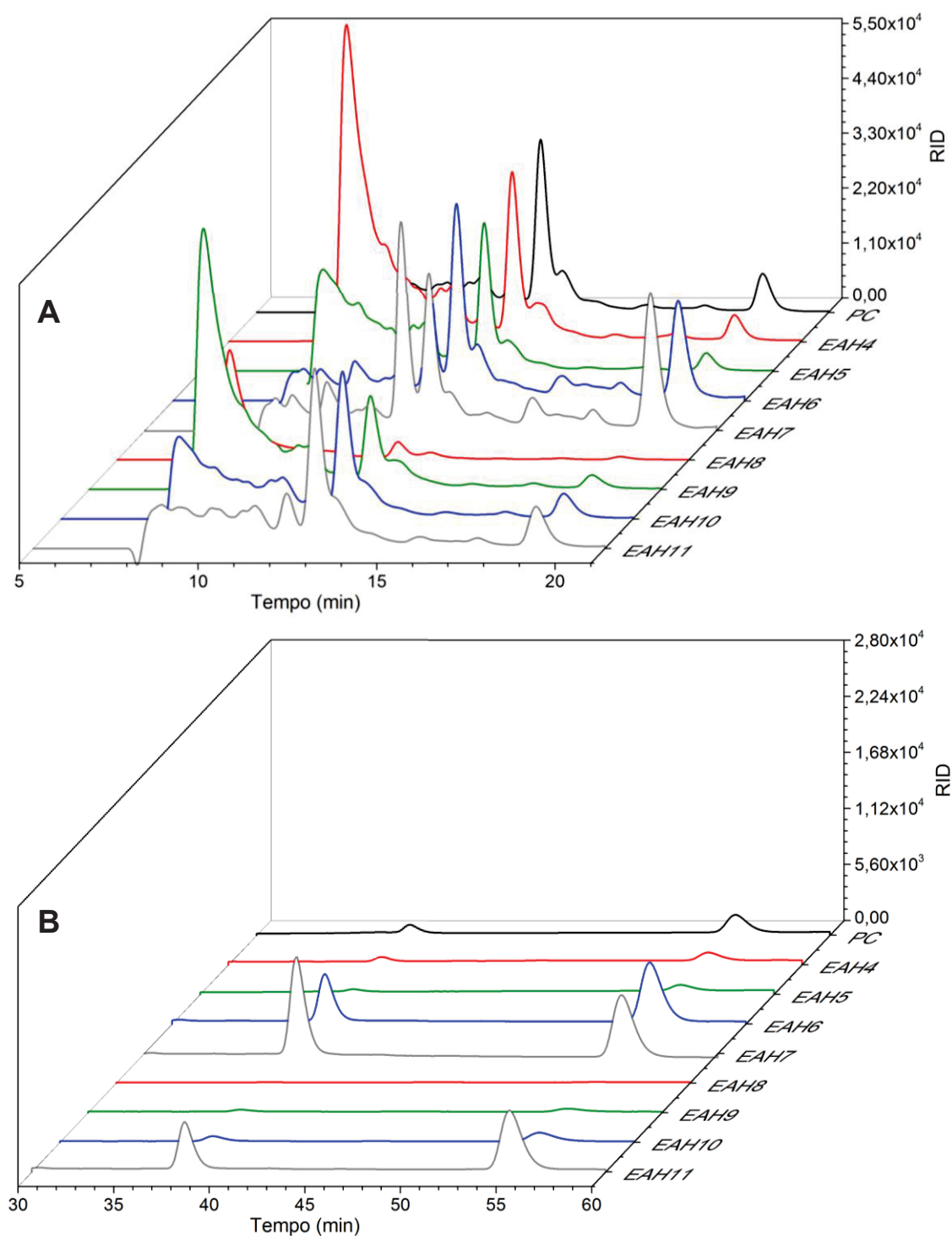
Os fatores de severidade obtidos para as explosões *E. urograndis* variaram de 3,05 a 4,49, sendo de 3,67 para o ponto central (195 °C por 7,5 min, EAH1, EAH2

e *EAH3*). A **Figura 20** revela a ocorrência de uma relação linear inversamente proporcional entre os rendimentos de pré-tratamento e o fator de severidade (expresso em  $\log R_0$ ), sendo que esta relação foi corroborada pelo valor de  $R^2$  obtido. Nesse caso, as condições de severidade mais baixa geraram rendimentos maiores, indicando uma menor solubilização do material lignocelulósico, com valores em torno de 97 % para *EAH4* (180 °C - 5 min) e *EAH8* (174 °C – 7,5 min). Por outro lado, perto de 50 % do material lignocelulósico foi solubilizado ou volatilizado nos vapores de purga do reator de alta pressão nas condições de maior severidade.



**Figura 20.** Relação entre o fator de severidade ( $\log R_0$ ) e rendimento da fração insolúvel (%) obtida na explosão a vapor de *E. urograndis* (marcador sem preenchimento = vértices do cubo, preenchidos = pontos axiais e x = ponto central do delineamento fatorial)

A fração solúvel derivada de cada experimento de auto-hidrólise foi analisada por HPLC para monitoramento da recuperação de carboidratos, ácidos orgânicos e compostos furânicos em função das diferentes condições pré-tratamento. De acordo com a **Figura 21A**, pré-tratamentos realizados a 180 °C (*EAH4* e *EAH5*) geraram hidrolisados ácidos contendo uma grande quantidade de oligômeros (tempo de retenção 9-11 min). Isto demonstra a ocorrência de hidrólise parcial das hemiceluloses durante o pré-tratamento, o que já foi relatado por muitos autores (Ramos, 2003; Alvira et al., 2010). Por outro lado, as explosões realizadas acima de 210 °C proporcionaram uma redução da concentração de oligômeros e o consequente aumento da presença de monossacarídeos.



**Figura 21.** Perfil cromatográfico após análise por HPLC das frações solúveis obtidas após o pré-tratamento (auto-hidrólise) de cavacos de *E. urograndis* sob diferentes condições de explosões a vapor, sendo (A) parte dos carboidratos e (B) compostos furânicos (PC = ponto central; EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura).

Os experimentos de maior severidade também resultaram em uma maior concentração de glucose (12,1 min) em relação à xilose (12,9 min), em função da hidrólise de frações mais acessíveis do componente celulósico e, neles, houve acúmulo de maiores quantidades de furfural e hidroximetilfurfural, que são decorrentes de desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente (**Figura 21B**). Neste sentido, é importante ressaltar que os cromatogramas na **Figura 21B** estão apresentados com metade da escala de concentração (RID) quando comparado com a **Figura 21A**, apenas para melhor visualização dos produtos de desidratação com tempo de retenção de 39 e 55 min, respectivamente.

A análise dos carboidratos das hemiceluloses presentes nestas frações solúveis também foi realizada por metanólise ácida (**Tabela 5**) evitando assim a degradação das unidades de ácidos urônicos que ocorrem durante a hidrólise ácida (Megaton et al., 2008).

Os componentes ácido 4-O-metil-glucurônico, arabinose, ramnose e ácido galacturônico estão presentes em maior quantidade quando foram empregadas condições mais brandas de pré-tratamentos (condições *EAH4* e *EAH8*, ambas com fator de severidade de 3,05, e *EAH9* com log  $R_0$  de 3,39). Isto indica que houve hidrólise parcial das pectinas presentes no material, principalmente como componentes da lamela média. A presença de ácido galacturônico e ramnose nos produtos de metanólise também sugerem que as pectinas de *E. urograndis* são majoritariamente compostas por ramnogalacturonanas.

Os teores de xilose e galactose também parecem ter sido reduzidos quando empregadas condições mais drásticas, especialmente as *EAH6* (210 °C, 5 min), *EAH7* (210 °C, 10 min) e *EAH11* (216 °C – 7,5 min) com log  $R_0$  de 3,94, 3,24 e 4,29, respectivamente, provavelmente devido à sua desidratação a compostos furânicos. Entretanto, é importante ressaltar que a glucose presente nos produtos de metanólise não é provavelmente oriunda da celulose, mas sim de hemiceluloses como xiloglucanas e galactoglucomanas.

A presença de oligossacarídeos nas frações solúveis derivadas do pré-tratamento foram analisadas pela técnica de HPTLC, onde cada componente foi caracterizado por um valor de  $R_f$  (índice de retenção) que é calculado pela razão entre a distância percorrida por cada componente da amostra e a distância percorrida pelo solvente.



**Tabela 5.** Metanólise das frações solúveis derivadas de *E. urograndis* pré-tratado por explosão a vapor, expressos em relação à massa seca de material e ajustados ao seu teor de sólidos totais.

| Componentes                 | Produtos de metanólise (g 100 g <sup>-1</sup> ) derivados dos seguintes materiais: |      |      |       |      |      |      |      |       |       |  |
|-----------------------------|--|------|------|-------|------|------|------|------|-------|-------|--|
|                             | Material nativo  | PC   | EAH4 | EAH5  | EAH6 | EAH7 | EAH8 | EAH9 | EAH10 | EAH11 |  |
| Arabinose                   | 0,25   | 0,07 | 0,10 | 0,18  | 0,15 | 0,09 | 0,11 | 0,14 | 0,20  | 0,13  |  |
| Ramnose                     | 0,34   | 0,14 | 0,14 | 0,34  | 0,15 | 0,11 | 0,17 | 0,21 | 0,33  | 0,24  |  |
| Xilose                      | 14,02  | 5,88 | 5,00 | 14,25 | 5,60 | 3,86 | 6,09 | 7,33 | 13,44 | 10,54 |  |
| Ácido galacturônico         | 1,30   | 0,09 | 0,16 | 0,26  | and  | and  | 0,18 | 0,21 | 0,31  | 0,19  |  |
| Ácido 4-O-metil-glucurônico | 6,32   | 0,37 | 1,17 | 2,19  | 0,43 | 0,73 | 1,30 | 1,55 | 1,96  | 1,05  |  |
| Manose                      | 1,03   | 0,77 | 0,38 | 1,12  | 0,92 | 0,72 | 0,42 | 0,50 | 1,27  | 1,13  |  |
| Galactose                   | 0,74   | 0,38 | 0,36 | 0,83  | 0,53 | 0,43 | 0,36 | 0,44 | 0,72  | 0,55  |  |
| Glucose                     | 2,88   | 0,93 | 0,33 | 0,93  | 4,03 | 5,52 | 0,49 | 0,56 | 1,40  | 1,86  |  |

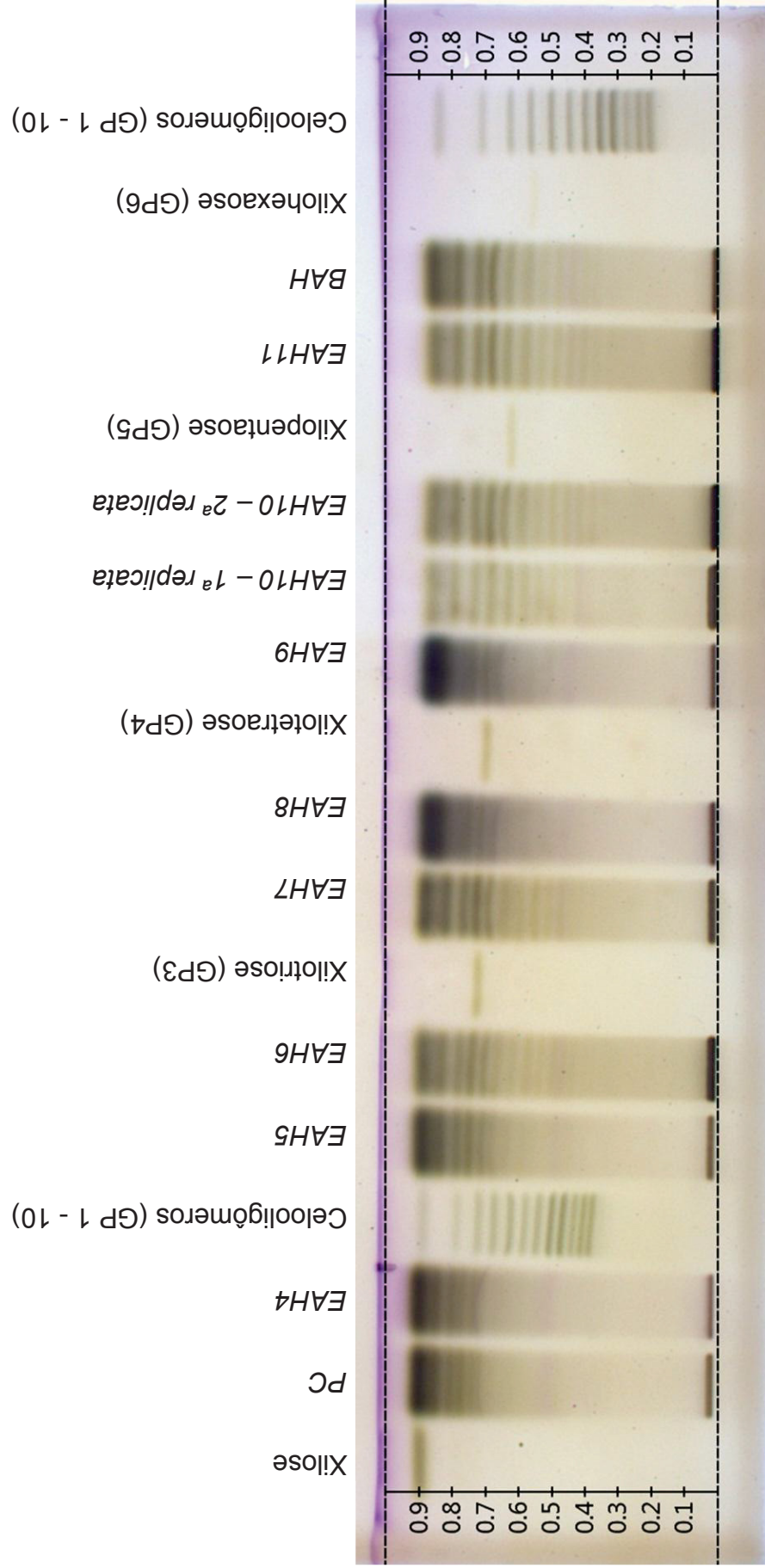
<sup>1</sup> Abaixo do nível de detecção;  
 PC = ponto central;  
 EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura.

Quatro padrões de xilooligômeros acetilados com GP de 3, 4, 5 e 6 foram aplicados intercaladamente nas cromatoplasas de HPTLC como padrões de referência, enquanto que a glucose e padrões de celooligômeros com diferentes graus de polimerização (também acetilados) foram aplicados em uma mesma corrida, conforme demonstra a **Figura 22**. Vale ressaltar que essa análise teve um caráter apenas qualitativo, não se prestando a uma análise quantitativa porque não houve controle sobre a concentração dos analitos em cada corrida.

Em linhas gerais, todas as frações solúveis derivadas da explosão a vapor apresentaram bandas relativas à série homóloga de xilo-oligossacarídeos (XOS) oriundos da hidrólise ácida das hemiceluloses, particularmente em amostras produzidas sob condições mais brandas. No entanto, a presença de xilose em algumas dessas corridas não pode ser explicada, já que essa não foi confirmada pelas análises de HPLC da **Figura 21**. Bandas de  $R_f$  não correlato aos padrões utilizados também são visíveis em várias corridas de HPTLC e essas podem estar relacionadas à presença de oligossacarídeos ácidos ou ramificados. A partir da condição central do planejamento fatorial (*PC*) em direção a condições de maior severidade (*EAH6*, *EAH7* e *EAH11*), foi ainda observada a ocorrência de bandas compatíveis com o  $R_f$  de celooligômeros, indicando que tais condições foram suficientes para a hidrólise de regiões mais acessíveis da estrutura da celulose. Vale ressaltar que apenas uma das amostras (*EAH10*) foi realizada em duplicata para demonstrar a repetibilidade da análise realizada por HPTLC.

Vale ressaltar que a presença de XOS nas frações hidrossolúveis derivadas da explosão a vapor de *E. urograndis* demonstra um grande potencial para a sua utilização na indústria farmacêutica, além de sua possível conversão em xilitol, cujas propriedades edulcorantes e não cariogênicas são muito apreciadas pela indústria alimentícia (Branco et al., 2011).

As composições químicas dos substratos celulósicos derivados dos experimentos de auto-hidrólise do eucalipto (fração insolúvel em água) foram determinadas e os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 6**. Esses dados demonstram que o processo de extração do eucalipto *in natura* removeu 1,7 % de extraíveis, resultando em um substrato com 46,8 % de glucana, 18,3 % de hemicelulose e 25,2 % de lignina total.



**Figura 22.** HPTLC com 2  $\mu$ L das amostras: PC, EAH4, EAH5, EAH6, EAH7, EAH8, EAH9, EAH10, EAH11 e BAH; 3  $\mu$ L dos padrões de xilose e xilooligômeros com diferentes graus de polimerização (GP3 - xilotriose, GP4 - xilotetraose, GP5 - xilopentaose e GP6 - xilohexaose) e 1 $\mu$ L de celooligômeros iniciando com glucose até GP10 (PC = ponto central; EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura).

**Tabela 6.** Composição química material *in natura* e dos substratos produzidos a partir do pré-tratamento por explosão a vapor em diferentes condições.

|                      | Exp.           | AnGlc <sup>1</sup> | Pent <sup>2</sup> | Grupo acetila    | Lignina solúvel | Lignina insolúvel | Cinzas    | Total |
|----------------------|----------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------------|-------------------|-----------|-------|
|                      | <b>nativo*</b> | 46,8 ± 0,8         | 15,3 ± 0,2        | 2,9 ± 0,2        | 0,1 ± 0,0       | 25,2 ± 1,4        | 0,4 ± 0,0 | 92,4  |
| <b>PC</b>            | <b>EAH1</b>    | 56,9 ± 5,3         | 3,8 ± 0,4         | and <sup>3</sup> | 0,5 ± 0,0       | 33,4 ± 0,8        | 0,3 ± 0,0 | 94,8  |
|                      | <b>EAH2</b>    | 59,9 ± 0,8         | 4,3 ± 0,6         | and              | 1,4 ± 0,2       | 35,0 ± 1,3        | 0,2 ± 0,0 | 100,8 |
|                      | <b>EAH3</b>    | 58,8 ± 3,4         | 4,3 ± 0,4         | and              | 0,4 ± 0,4       | 33,0 ± 0,5        | 0,3 ± 0,0 | 97,3  |
| <b>Vértices</b>      | <b>EAH4</b>    | 54,9 ± 2,7         | 9,6 ± 0,2         | 1,6 ± 0,0        | 0,9 ± 0,7       | 27,3 ± 2,5        | 0,3 ± 0,0 | 94,5  |
|                      | <b>EAH5</b>    | 55,1 ± 1,6         | 7,7 ± 0,0         | 1,2 ± 0,0        | 1,1 ± 0,0       | 29,5 ± 1,6        | 0,3 ± 0,0 | 94,9  |
|                      | <b>EAH6</b>    | 58,4 ± 7,8         | 2,6 ± 1,5         | and              | 1,2 ± 0,5       | 36,1 ± 1,9        | 0,2 ± 0,1 | 98,5  |
|                      | <b>EAH7</b>    | 59,4 ± 1,2         | 1,2 ± 0,1         | and              | 1,6 ± 0,2       | 34,2 ± 1,6        | 0,2 ± 0,0 | 96,6  |
| <b>Pontos axiais</b> | <b>EAH8</b>    | 56,8 ± 2,6         | 3,6 ± 0,1         | and              | 1,9 ± 0,5       | 35,2 ± 0,5        | 0,3 ± 0,1 | 97,9  |
|                      | <b>EAH9</b>    | 46,2 ± 1,2         | 13,0 ± 0,3        | 2,2 ± 0,1        | 1,9 ± 0,4       | 28,3 ± 3,8        | 0,3 ± 0,0 | 92,0  |
|                      | <b>EAH10</b>   | 57,4 ± 0,6         | 5,9 ± 0,3         | and              | 1,3 ± 0,1       | 32,8 ± 0,2        | 0,2 ± 0,0 | 97,7  |
|                      | <b>EAH11</b>   | 48,1 ± 3,6         | 8,3 ± 0,7         | and              | 1,7 ± 0,2       | 33,9 ± 0,7        | 0,2 ± 0,0 | 92,3  |

\* Material *in natura* com teor de extraíveis de 1,7 ± 0,1

<sup>1</sup> O percentual de hidroximetilfurfural está expresso como equivalentes de anidroglicose;

<sup>2</sup> Os percentuais de xilose, manose e galactose, além do furfural, estão expressos em pentosanas porque a coluna cromatográfica empregada não é capaz de resolver esses monossacarídeos;

<sup>3</sup> Abaixo do nível de detecção;

PC = ponto central;

EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura.

É importante ressaltar que os produtos de metanólise ácida das frações solúveis derivadas do pré-tratamento forneceram informações mais fidedignas sobre a composição química das hemiceluloses presentes nos materiais nativo e pré-tratado, já que a coluna cromatográfica empregada para gerar os dados da **Tabela 6** não era capaz de resolver xilose, manose e galactose (**Tabela 5**). Assim, para evitar uma má interpretação dos resultados, os teores desses componentes nas hemiceluloses foram representados nos dados de composição química como pentosanas. Finalmente, ao comparar os teores obtidos para os substratos pré-tratados em relação ao material *in natura*, fica claro que o aumento da severidade do pré-tratamento está diretamente relacionado com a remoção das hemiceluloses, mesmo porque esses polissacarídeos são mais lábeis à hidrólise ácida.

A explosão a vapor aumentou o teor de glucanas dos cavacos a 59,9 %, sendo que as amostras *EAH2* e *EAH6* apresentaram os maiores valores, enquanto que o teor de hemiceluloses diminuiu até o limite de 1,2 %, dependendo das condições empregadas. Assim, a porcentagem de lignina insolúvel em ácido aumentou nos materiais pré-tratados, principalmente devido à remoção de hemiceluloses. Os teores de cinzas ficaram relativamente os mesmos, enquanto que os grupos acetila foram removidos até ficarem abaixo do nível de detecção do método utilizado para análise.

A **Tabela 7** demonstra que as pectinas presentes no eucalipto foram parcialmente hidrolisadas e passaram a ser contabilizadas na fração solúvel, particularmente quando empregadas condições mais drásticas de explosão a vapor. Nesse sentido, componentes de materiais pécticos como o ácido galacturônico e a ramnose, além de galactose e arabinose, apresentaram valores abaixo do nível de detecção, principalmente para os experimentos *EAH6*, *EAH7* e *EAH11*, cujos valores de log  $R_0$  foram de 3,94, 4,24 e 4,49, respectivamente. A arabinose foi detectada apenas na condição mais branda de pré-tratamento (*EAH4*) cujo fator de severidade era de apenas 3,05. O mesmo ocorreu com outros açúcares das hemiceluloses, como xilose e manose, cujas concentrações foram muito baixas nessas condições, indicando novamente sua solubilização para a fração solúvel. Por outro lado, quanto mais drásticas as condições de pré-tratamento (e.g., *EAH8*), maior a presença de glucose nas frações insolúveis. Assumindo que a metanólise ácida é um processo seletivo para a análise de hemiceluloses, esse dado sugere que resíduos de xilopiranosil, presentes em polissacarídeos como heteroxilanas e xiloglucanas, foram eficientemente removidos e que no caso das xiloglucanas, isto se deu sem um maior comprometimento da cadeia principal que, destituída destes substituintes, aumentou a sua afinidade pelas cadeias lineares da celulose. Por outro lado, parte da glucose detectada nesse ensaio também pode ter sido oriunda de regiões menos organizadas (amorfas) do componente celulósico. Essa análise também permitiu concluir que as hemiceluloses de eucalipto contêm galactoglucomanas e arabinoglucuronoxilanas, cuja análise estrutural somente seria possível mediante o uso de um procedimento de extração seletivo e não destrutivo.

**Tabela 7.** Metanólise das frações insolúveis derivadas de *E. urograndis* pré-tratado por explosão a vapor, considerando o seu rendimento mássico e expressando os valores obtidos em relação à massa seca do material *in natura*.

| Componentes                 | Produtos de metanólise (g 100 g <sup>-1</sup> ) derivados dos seguintes materiais: |                  |      |      |      |      |      |      |       |       |  |
|-----------------------------|--|------------------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|--|
|                             | Material nativo  | PC               | EAH4 | EAH5 | EAH6 | EAH7 | EAH8 | EAH9 | EAH10 | EAH11 |  |
| Arabinose                   | 0,25   | and <sup>1</sup> | and  | and  | and  | and  | 0,16 | and  | and   | and   |  |
| Ramnose                     | 0,34   | 0,34             | 0,23 | 0,13 | and  | and  | 0,60 | 0,32 | 0,10  | and   |  |
| Xilose                      | 14,02  | 0,23             | 0,21 | 0,16 | 0,04 | 0,01 | 0,58 | 0,25 | 0,11  | 0,05  |  |
| Ácido galacturônico         | 1,30   | 0,24             | 0,34 | and  | and  | and  | 0,40 | and  | and   | 0,13  |  |
| Ácido 4-O-metil-glucurônico | 6,32   | 0,21             | 0,17 | 0,10 | 0,03 | and  | 0,39 | 0,24 | 0,08  | 0,04  |  |
| Manose                      | 1,03   | 0,36             | 0,55 | 0,27 | 0,07 | 0,02 | 0,50 | 0,37 | 0,15  | 0,08  |  |
| Galactose                   | 0,74   | 0,22             | 0,27 | 0,10 | and  | and  | 0,56 | 0,27 | 0,04  | and   |  |
| Glucose                     | 2,88   | 0,66             | 0,74 | 0,64 | 0,54 | 0,37 | 0,72 | 0,76 | 0,70  | 0,77  |  |

<sup>1</sup> Abaixo do nível de detecção;  
PC = ponto central;  
EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura.

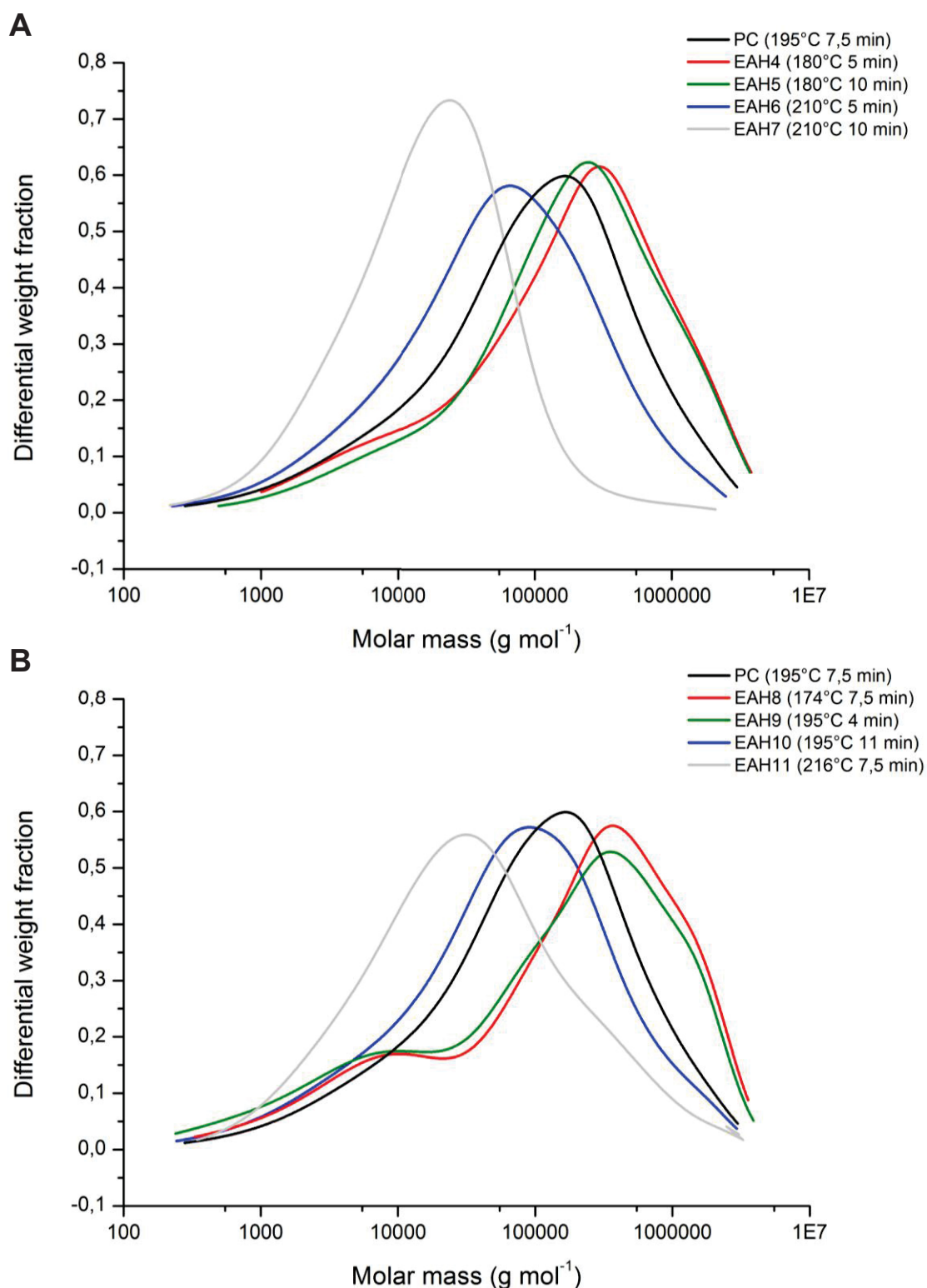
As frações insolúveis em água oriundas de diferentes condições de pré-tratamento foram deslignificadas em condições controladas para serem posteriormente dissolvidas em líquido iônico (DMAc/LiCl 9%) e analisadas por GPC conforme descrito no item 4.2.1.6 desse documento. A distribuição em massas molares (MM) das amostras referentes ao ponto central e do vértice do delineamento fatorial estão apresentadas na **Figura 23A**, enquanto a **Figura 23B** exhibe os resultados obtidos para os seus pontos axiais, novamente em relação ao ponto central do planejamento.

Os perfis de GPC da Figura 18 demonstram que a distribuição se deslocou para a região de massas molares mais baixas com o aumento da severidade do pré-tratamento. Isso demonstra que o componente celulósico do material de origem sofreu hidrólise ácida parcial, liberando fragmentos de cadeia menores que apresentaram uma massa molar com média mássica ( $MM_M$ ) de  $1,411 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ , o que representa um terço do tamanho médio de cadeia que foi observado para a condição de menor severidade, que foi de  $4,584 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ . A **Tabela 8** apresenta as médias numérica e mássica ( $MM_N$  e  $MM_M$ ) das massas molares de todos os substratos pré-tratados, juntamente aos seus respectivos valores de polidispersidade ( $PD = MM_M/MM_N$ ) e graus de polimerização ( $GP_N$  e  $GP_M$ ).

Os perfis de eluição da **Figura 23** sugerem o desaparecimento do ombro usualmente atribuído à presença das hemiceluloses, particularmente para amostras oriundas de condições mais severas de pré-tratamento. No entanto, sabe-se que as hemiceluloses estão presentes em diferentes percentuais na composição centesimal desses substratos (**Tabela 7**). Portanto, o desaparecimento do ombro pode ter sido decorrente da própria hidrólise parcial das glucanas (celulose) que, devido ao deslocamento observado, acabaram por superpor a banda de eluição atribuível às hemiceluloses.

A polidispersidade (PD) é outra maneira de avaliar o efeito da explosão a vapor sobre o GP dos polissacarídeos presentes nos substratos pré-tratados. Esse valor dá uma ideia da amplitude da distribuição obtida, o que está diretamente ligado ao deslocamento mencionado no parágrafo anterior.





**Figura 23.** Distribuição em massas molares dos substratos designificados que foram preparados a partir de *E. urograndis* explodido a vapor. **(A)** Vértices e **(B)** pontos axiais do delineamento fatorial  $2^2$  em relação ao seu ponto central (PC = ponto central; EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura).

**Tabela 8.** Massas molares, polidispersidade e grau de polimerização dos polissacarídeos (holocelulose) presentes em substratos deslignificados derivados de *E. urograndis* por explosão a vapor.

| Amostra           | MM <sub>N</sub> (g mol <sup>-1</sup> ) | MM <sub>M</sub> (g mol <sup>-1</sup> ) | PD    | GP <sub>N</sub> | GP <sub>M</sub> |
|-------------------|--|--|-------|-----------------|-----------------|
| PC <sup>7</sup>   | 1,608×10 <sup>4</sup>                  | 2,705×10 <sup>5</sup>                  | 16,82 | 99              | 1670            |
| EAH4 <sup>8</sup> | 2,666×10 <sup>4</sup>                  | 4,584×10 <sup>5</sup>                  | 17,19 | 165             | 2830            |
| EAH5              | 2,831×10 <sup>4</sup>                  | 4,426×10 <sup>5</sup>                  | 15,63 | 175             | 2732            |
| EAH6              | 1,147×10 <sup>4</sup>                  | 1,692×10 <sup>5</sup>                  | 14,75 | 71              | 1044            |
| EAH7              | 6,644×10 <sup>3</sup>                  | 5,228×10 <sup>4</sup>                  | 7,87  | 41              | 323             |
| EAH8              | 1,368×10 <sup>4</sup>                  | 4,965×10 <sup>5</sup>                  | 36,29 | 84              | 3065            |
| EAH9              | 8,830×10 <sup>3</sup>                  | 4,560×10 <sup>5</sup>                  | 51,64 | 55              | 2815            |
| EAH10             | 1,149×10 <sup>4</sup>                  | 2,148×10 <sup>5</sup>                  | 18,69 | 71              | 1326            |
| EAH11             | 9,220×10 <sup>3</sup>                  | 1,411×10 <sup>5</sup>                  | 15,30 | 57              | 871             |

<sup>1</sup> MM<sub>N</sub> = massa molar média em número;

<sup>2</sup> MM<sub>M</sub> = massa molar média em massa;

<sup>3</sup> PD = polidispersidade (MM<sub>M</sub>/MM<sub>N</sub>);

<sup>4</sup> GP<sub>N</sub> = grau de polimerização associado ao número molar média em número;

<sup>5</sup> GP<sub>M</sub> = grau de polimerização associado ao número molar média em massa;

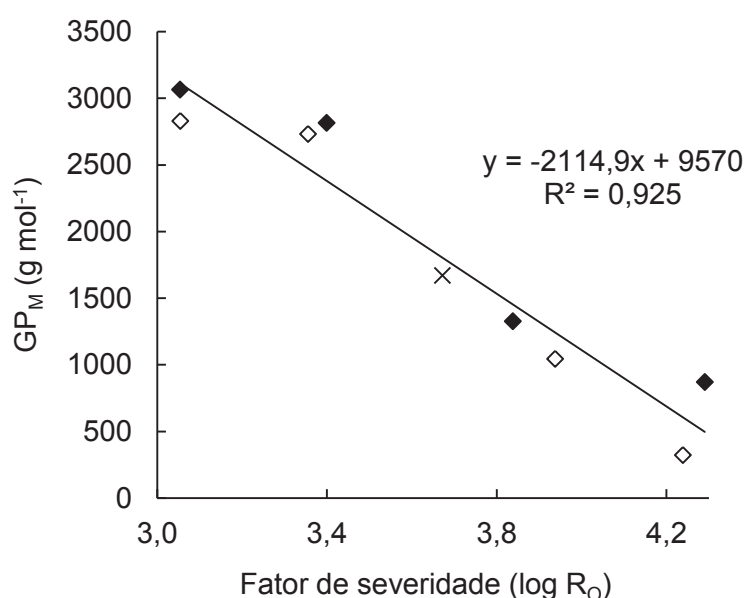
<sup>7</sup> PC = ponto central

<sup>8</sup> EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura

Em geral, nenhuma tendência foi constatada nos valores de PD, exceto nos pré-tratamentos mais amenos, que tenderam a produzir polidispersidade maiores devido ao efeito do ombro localizado à esquerda sobre a distribuição de cadeias de celulose que não sofreram uma perda de MM<sub>M</sub> muito expressiva durante o processo de explosão a vapor (e.g., EAH8 e EAH9). Já para substratos oriundos de condições mais severas (e.g., EAH7 e EAH11), os valores de PD foram muito menores em relação aos obtidos para os outros pontos do planejamento fatorial, indicando o grau de hidrólise parcial da celulose e a provável remoção da porção hemicelulósica do substrato.

Por um efeito meramente didático, os dados de MM<sub>M</sub> e MM<sub>N</sub> da **Tabela 8** foram convertidos nos seus respectivos graus de polimerização (GP<sub>M</sub> e GP<sub>N</sub>) mediante divisão pela massa molar de uma unidade de anidroglicose, que corresponde a 162 g mol<sup>-1</sup>. Esses valores foram então correlacionados com o fator de severidade de cada condição, expresso em log R<sub>O</sub> conforme demonstram os dados da **Figura 24**. O coeficiente de regressão linear (R<sup>2</sup>) obtido foi de 0,925 demonstrando a existência de

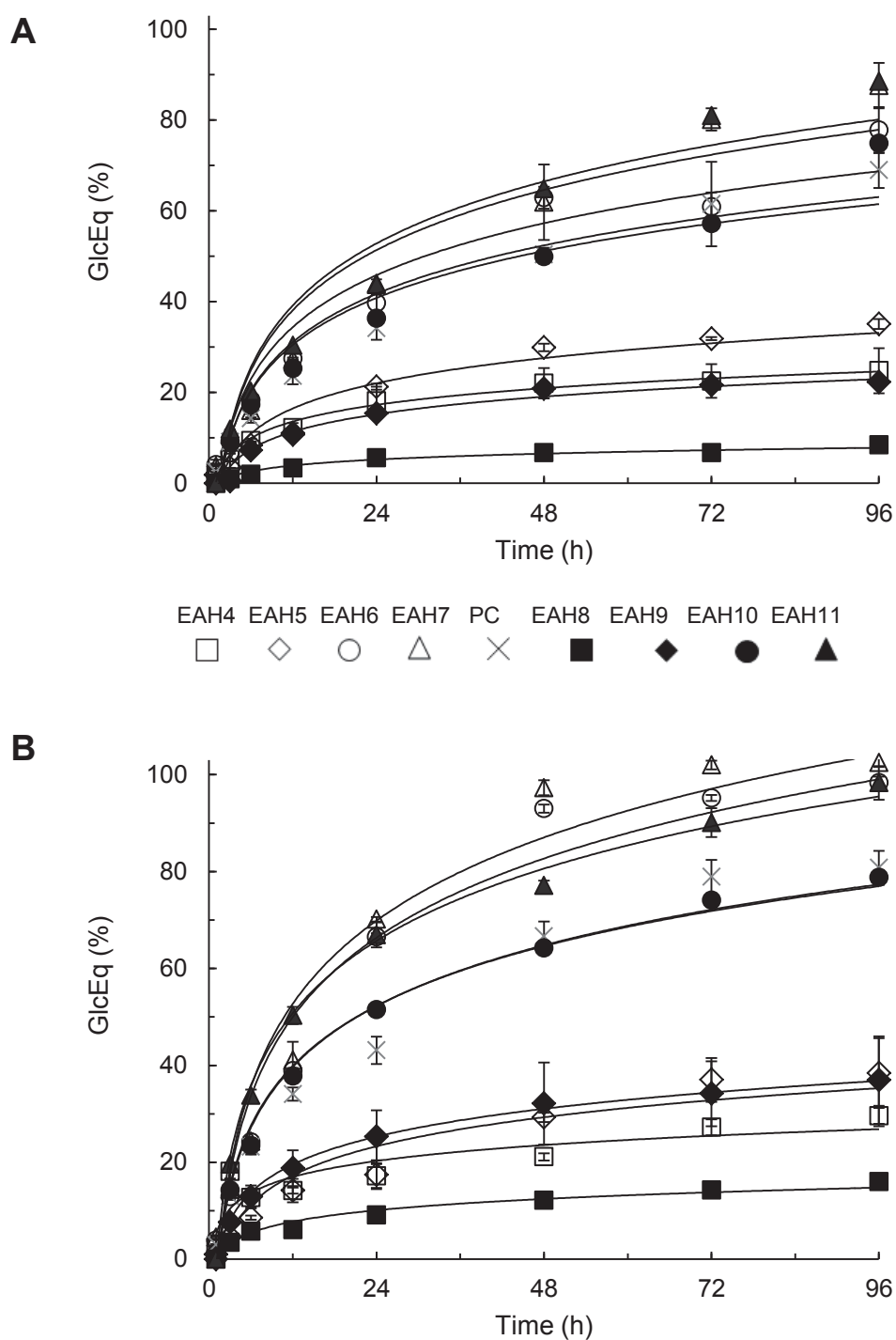
relação diretamente proporcional entre essas grandezas, a exemplo do que já havia sido observado para outras variáveis do processo. Severidades menores geraram substratos com alto  $GP_M$  (e.g., *EAH4* e *EAH8*, ambas com  $\log R_O$  de 3,05), enquanto que severidades maiores reduziram o  $GP_M$  a valores bastante inferiores que, no caso do experimento *EAH7*, atingiu valores próximos à celulose microcristalina ( $GP_M$  de  $323 \text{ g mol}^{-1}$ ). O  $GP_M$  observado em *EAH11* foi de  $871 \text{ g mol}^{-1}$ , significando que o tempo maior de residência no reator pode ter sido de maior influência do que aumento da temperatura de pré-tratamento.



**Figura 24.** Relação entre o fator de severidade ( $\log R_O$ ) e o grau de polimerização ( $GP_M$ ) dos substratos desdesignificados derivados de *E. urograndis* por explosão a vapor.

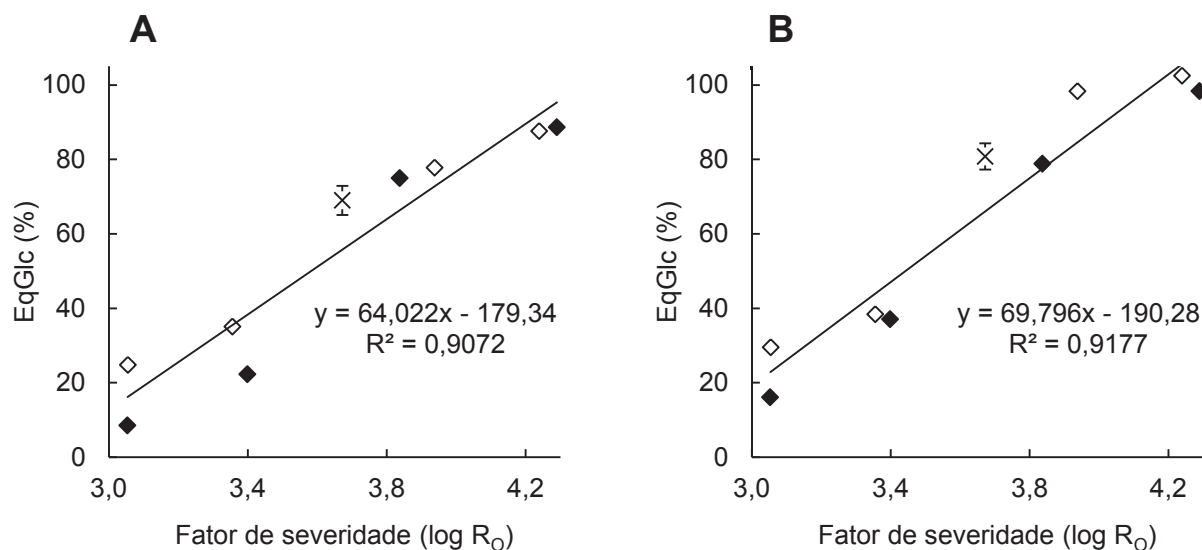
Após as etapas de pré-tratamento e caracterização dos substratos pré-tratados, a sua susceptibilidade à hidrólise enzimática foi avaliada empregando Cellic CTec2 e Cellic CTec3. Os perfis da hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados com ambas as enzimas estão apresentados na **Figura 25**.

Em geral, conversões mais altas foram obtidas quando empregadas condições mais severas de pré-tratamento. Ainda foi possível observar que as curvas das condições de *EAH11* e *EAH7* ficaram bem próximas ao longo das 96 h de hidrólise quando usada a CTec2, mas, no caso da CTec3, a condição *EAH11* alcançou o maior valor de 98,31 % de conversão.



**Figura 25.** Hidrólise enzimática do *E. urograndis* em equivalentes de glucose (%) em relação ao tempo de reação, empregando **(A)** Cellic CTec2 e **(B)** Cellic CTec3 (marcador sem preenchimento = vértices do cubo, preenchidos = pontos axiais e x = ponto central do delineamento fatorial, PC = ponto central; EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura).

Os valores de EqGlc (%) no tempo de 96 h foram então relacionados ao fator de severidade de cada condição, expresso em  $\log R_O$ , e os coeficientes de regressão linear obtidos foram de 0,9072 e 0,9177 para Cellic CTec2 e Cellic CTec3, respectivamente. Isto demonstra que a exposição do material a altas temperaturas e por maiores tempos de pré-tratamento gerou melhores substratos para a hidrólise enzimática (**Figura 26**).



**Figura 26.** Relação entre fator de severidade ( $\log R_O$ ) e os equivalentes de glucose (%) obtidos na hidrólise enzimática de cavacos de *E. urograndis* pré-tratado a vapor empregando **(A)** Cellic CTec2 e **(B)** Cellic CTec3 (marcador sem preenchimento = vértices do cubo, preenchidos = pontos axiais e x = ponto central do delineamento fatorial)

Ao utilizar condições mais severas de pré-tratamento, houve maior remoção das hemiceluloses via hidrólise ácida, paralelamente à desidratação parcial dos carboidratos formando compostos furânicos que podem atuar como inibidores e reduzir os rendimentos da hidrólise enzimática (Martin-Sampedro et al., 2014).

Estes valores de conversão em EqGlc (%) no tempo de 96 h foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e os resultados estão apresentados na **Tabela 9**. Vale ressaltar que a função resposta selecionada foi baseada na estratégia SHF para a produção de etanol celulósico, reservando, portanto, a fração C5 para outras aplicações que não associadas à produção de etanol. Em geral, para todas as respostas estudadas, é possível constatar que os altos valores de F, encontrados

para as regressões em relação aos respectivos  $F_{\text{tab}}$ , demonstram que o grupo de dados não representa um artefato matemático, e que existem tendências quando estes são modelados pelas equações empregadas. Além disso, os baixos valores de  $F$  para a falta de ajuste, em relação ao respectivo valor de  $F_{\text{tab}}$ , indicam que os resíduos existentes nos respectivos modelos são praticamente nulos. Estes fatores são ainda corroborados pelos altos valores de  $R^2$  e das variâncias máximas explicadas.

**Tabela 9.** Análise de variância dos equivalentes de glucose produzido em 96 h para Cellic CTec2 e Cellic CTec3.

| FONTE              | SQ      | GL             | MQ      | F             | $F_{\text{tab}}$ |
|--------------------|---------|----------------|---------|---------------|------------------|
| <i>EqGlc CTec2</i> |         | $R^2 = 0,9572$ |         | % Var = 99,64 |                  |
| Regressão          | 7875,12 | 5              | 1575,02 | 14,95         | 5,05             |
| Resíduo            | 526,86  | 5              | 105,37  |               |                  |
| Falta de ajuste    | 497,14  | 3              | 165,71  | 11,15         | 19,16            |
| Erro puro          | 29,73   | 2              | 14,86   |               |                  |
| Total              | 8227,37 | 10             |         |               |                  |
| <i>EqGlc CTec3</i> |         | $R^2 = 0,9679$ |         | % Var = 99,45 |                  |
| Regressão          | 9306,95 | 5              | 1861,39 | 18,03         | 5,05             |
| Resíduo            | 516,23  | 5              | 103,25  |               |                  |
| Falta de ajuste    | 489,06  | 3              | 163,02  | 12,00         | 19,16            |
| Erro puro          | 27,17   | 2              | 13,58   |               |                  |
| Total              | 9615,89 | 10             |         |               |                  |

%Var, Máxima variância explicável; SQ = soma dos quadrados;

GL, grau de liberdade; MQ = média dos quadrados;

F, distribuição de Fischer encontrada;

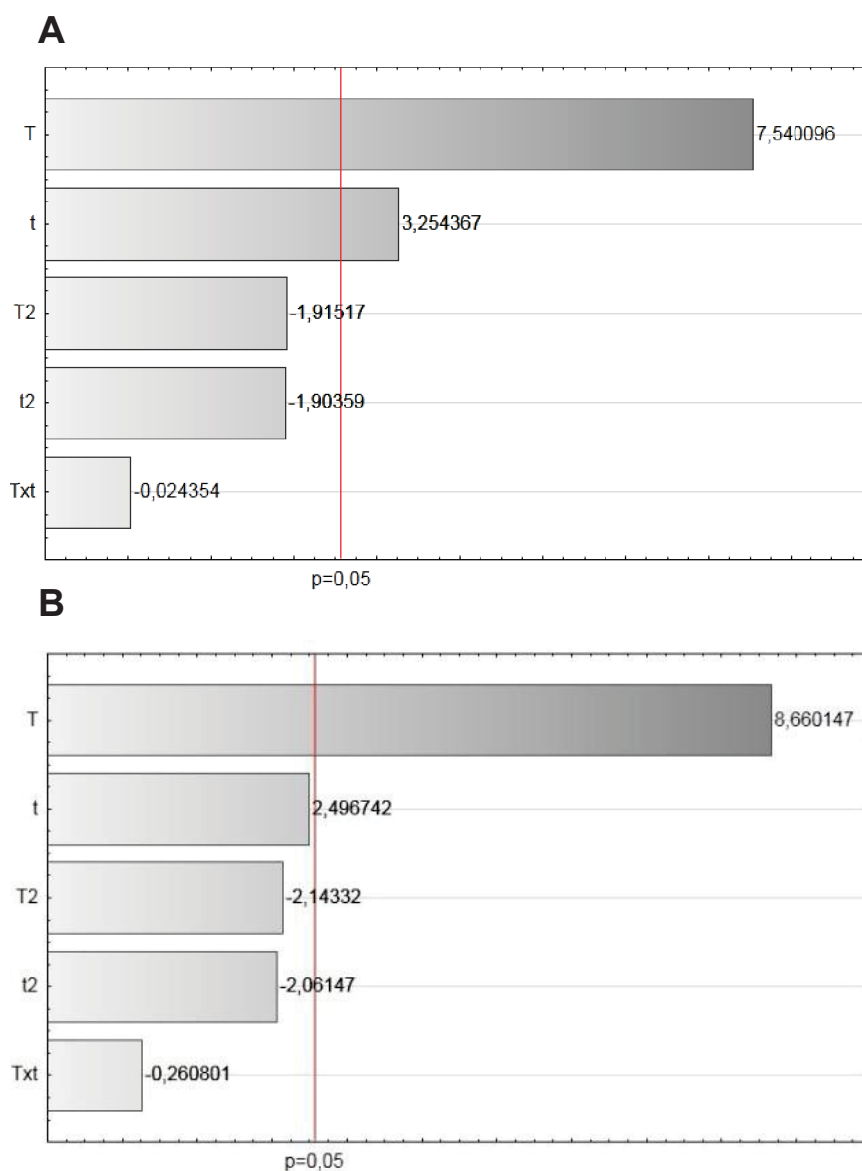
$F_{\text{tab}}$  = distribuição de Fischer tabelada.

Os pontos centrais do planejamento para  $\text{EqGlc}_{\text{CTec2}}$  e para  $\text{EqGlc}_{\text{CTec3}}$ , resultaram em erros experimentais aceitáveis, que no tempo de 72 h foram de 5 e 8 % em relação ao valor média, respectivamente. As equações obtidas com a variável independente, os coeficientes lineares e quadráticos e a interação entre temperatura e tempo estão apresentados a seguir nas **Equações 5 e 6**.

$$\text{EqGlc}_{\text{CTec2}} = 68,93 + 27,36 \cdot T - 8,27 \cdot T^2 + 11,81 \cdot t - 8,22 \cdot t^2 - 0,13 \cdot T \cdot t \quad (\text{Equação 5})$$

$$\text{EqGlc}_{\text{CTec3}} = 80,27 + 31,11 \cdot T - 9,16 \cdot T^2 + 8,97 \cdot t - 8,81 \cdot t^2 - 1,33 \cdot T \cdot t \quad (\text{Equação 6})$$

Foram ainda elaborados os respectivos Gráficos de Pareto para analisar o significado numérico das tendências observadas, expressando os efeitos estatísticos em relação ao valor de  $p$  para o grau de liberdade dos experimentos realizados em um intervalo de confiança de 95 % (**Figura 27**).



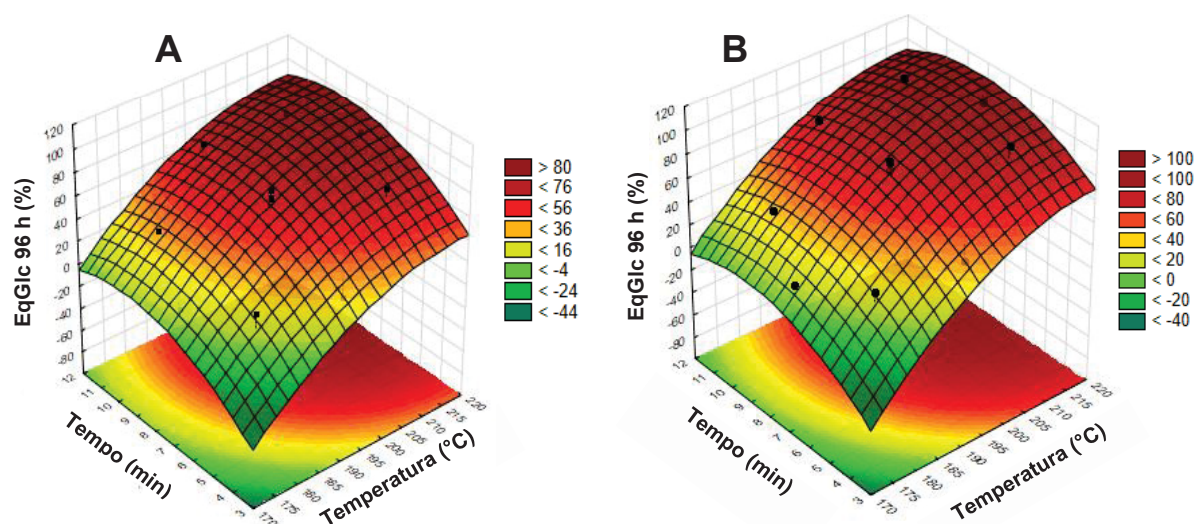
**Figura 27.** Gráfico de Pareto para EqGlc (%) obtidos partir da hidrólise enzimática com (A) Cellic CTec2 e (B) empregando Cellic CTec3.

A **Figura 27A** indica que os efeitos primários do tempo e da temperatura foram significativos, entretanto, a temperatura exerceu uma influência maior sobre a função resposta no caso da Cellic CTec2. Já a **Figura 27B** indica que a temperatura foi o



único fator a apresentar efeito estatisticamente significativo para Cellic CTec3 e, em ambos os casos, o efeito de interação ( $T \times t$ ) e os coeficientes quadráticos destas variáveis não tiveram nenhuma relevância estatística. Apesar dessa diferença, as principais variáveis do pré-tratamento apresentaram o mesmo efeito sobre a eficiência de hidrólise das duas enzimas, apesar dessas terem liberado diferentes quantidades de produto após a hidrólise.

Após confirmação da validade estatística das tendências associadas ao modelo, os dados derivados do planejamento fatorial foram então organizados na forma de uma superfície de resposta, conforme mostrado na **Figura 28**, de onde se pode observar a maior influência da temperatura sobre os resultados obtidos. Conforme indicado nas superfícies de resposta, a região onde os valores apresentaram alta conversão ocorreu quando empregados fatores de severidade entre 3,67 e 4,29 no pré-tratamento. O pré-tratamento mais severo (*EAH11*, 216 °C por 7,5 min) resultou no substrato mais susceptível à hidrólise em ambos os casos, oferecendo rendimentos de sacarificação acima de 88 % em relação ao seu teor de celulose. No entanto, o uso de condições mais severas com  $\log R_O$ , superiores a 3,67, levou a maiores perdas de massa, podendo gerar um maior acúmulo de inibidores no processo de fermentação.



**Figura 28.** Superfícies de resposta que descrevem a variação dos EeqGlc (%) obtidos partir da hidrólise enzimática com (A) Cellic CTec2 e (B) Cellic CTec3.

Com a finalidade de encontrar a melhor condição experimental de pré-tratamento, foi necessário considerar a recuperação de anidroglicose no substrato pré-tratado em paralelo aos seus rendimentos de hidrólise enzimática. Sendo assim, a melhor condição de tempo e temperatura foi definida como 210 °C e 5 min, com log  $R_O$  de 3,94, previamente denominada EAH6 (**Tabela 10**).

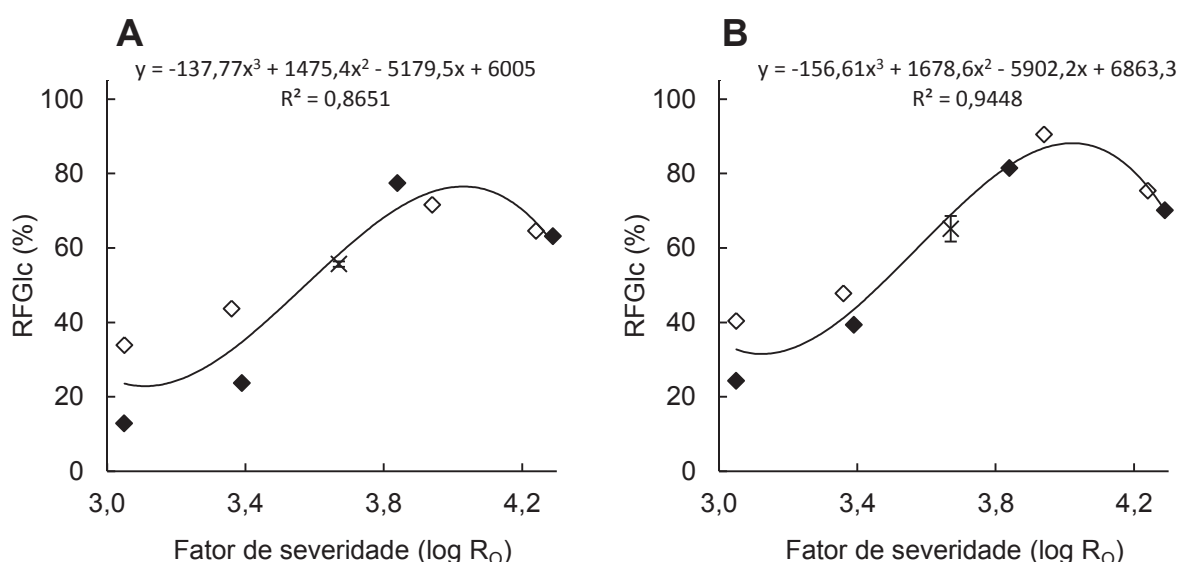
Quando empregada Cellic CTec2 na hidrólise enzimática foi possível notar que a condição *EAH6*, mesmo não apresentando a melhor conversão em EqGlc (77,8 %), proporcionou uma recuperação significativa de anidroglicose em relação ao cavaco *in natura* (71,6 %), sendo superada pela condição mais drástica (*EAH10*, log  $R_O$  de 3,84), que alcançou 77,4 % de rendimento final. Entretanto, a condição EAH6 se sobressai quando utilizada a Cellic CTec3, onde foi possível observar um aumento na conversão do substrato de 26,4 % e um rendimento final de glicose de 90,5 %. Este valor foi superior ao obtido pela condição *EAH10*, que alcançou 81,4 % de rendimento final.

**Tabela 10.** Rendimentos da fração insolúvel ( $R_{FI}$ ), equivalentes de glicose após 96h de hidrólise enzimática e rendimento final de glicose ( $RF_{Glc}$ ) para o eucalipto.

| Pré-tratamento |           | $R_{FI}$ (%) | Cellic CTec2   |                | Cellic CTec3    |                |
|----------------|-----------|--------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| Exp.           | log $R_O$ |              | EqGlc (%)      | $RF_{Glc}$ (%) | EqGlc (%)       | $RF_{Glc}$ (%) |
| <b>EAH1*</b>   | 3,67      | 65,9         | 73,3 $\pm 3,0$ | 55,8           | 83,1 $\pm 0,8$  | 67,6           |
| <b>EAH2</b>    | 3,67      | 72,9         | 67,5 $\pm 1,0$ | 56,3           | 81,6 $\pm 0,5$  | 66,7           |
| <b>EAH3</b>    | 3,67      | 65,3         | 66,0 $\pm 0,1$ | 54,9           | 76,1 $\pm 0,4$  | 61,2           |
| <b>EAH4</b>    | 3,05      | 96,9         | 24,8 $\pm 4,9$ | 33,9           | 29,5 $\pm 2,1$  | 40,4           |
| <b>EAH5</b>    | 3,36      | 85,6         | 35,1 $\pm 1,1$ | 43,7           | 38,4 $\pm 7,1$  | 47,8           |
| <b>EAH6</b>    | 3,94      | 61,4         | 77,8 $\pm 5,0$ | 71,6           | 98,4 $\pm 1,3$  | 90,5           |
| <b>EAH7</b>    | 4,24      | 48,5         | 87,6 $\pm 4,9$ | 64,6           | 102,0 $\pm 1,9$ | 75,4           |
| <b>EAH8</b>    | 3,05      | 97,0         | 8,4 $\pm 0,5$  | 12,9           | 16,0 $\pm 0,2$  | 24,3           |
| <b>EAH9</b>    | 3,39      | 89,6         | 22,3 $\pm 0,9$ | 23,7           | 36,9 $\pm 7,5$  | 39,3           |
| <b>EAH10</b>   | 3,84      | 70,0         | 74,9 $\pm 6,9$ | 77,4           | 78,8 $\pm 5,5$  | 81,4           |
| <b>EAH11</b>   | 4,29      | 57,6         | 88,6 $\pm 2,4$ | 63,1           | 98,3 $\pm 3,4$  | 70,1           |

\* EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura)

Os valores de rendimento final de glucose foram então correlacionados com o fator de severidade expresso em  $\log R_O$ , conforme apresentado na **Figura 29**. A **Figura 29A** revela que os pontos de maior rendimento para a enzima Cellic CTec2 foram relativos às condições *EAH10* e *EAH6*. Entretanto, para a enzima Cellic CTec3 (**Figura 29B**), houve uma inversão entre esses resultados, sendo que o maior rendimento foi observado para a condição *EAH6*. Tal observação pode ser considerada uma evidência preliminar de que a Cellic CTec3 é mais eficiente na hidrólise de substratos produzidos em severidades menores do que a Cellic CTec2. Por outro lado, severidades mais altas, apesar de proporcionarem alta conversão na hidrólise enzimática, podem se revelar não ideais porque resultam em rendimentos de recuperação de glucanas muito baixos na fração insolúvel, levando a uma redução do rendimento final de glucose ao final do processo.



**Figura 29.** Relação entre fator de severidade ( $\log R_O$ ) e os rendimentos finais de glucose (%) obtidos após pré-tratamento e hidrólise enzimática de *E. urograndis* pré-tratado a vapor, empregando **(A)** Cellic CTec2 e **(B)** Cellic CTec3 (marcador sem preenchimento = vértices do cubo, preenchidos = pontos axiais e x = ponto central do delineamento fatorial).

#### 4.2.6 Deslignificação alcalina

Conforme descrito na metodologia item 4.2.2, três tipos de pré-tratamentos foram realizados com o eucalipto no total: explosão a vapor, deslignificação alcalina e o processo combinado entre eles. Quando a deslignificação alcalina foi empregada

sobre o material pré-tratado por explosão a vapor, decidiu-se utilizar as melhores condições dos procedimentos de otimização, que correspondeu ao pré-tratamento a 210 °C por 5 min, com  $\log R_O$  foi de 3,94 (*EAH6*), seguido de hidrólise enzimática utilizando Cellic CTec3 (**Figura 29B**).

A deslignificação foi mais acentuada quando empregado o pré-tratamento combinado (explosão a vapor + extração alcalina) utilizando 0,5 g de NaOH g<sup>-1</sup> substrato seco (**Tabela 11**). Estas condições resultaram em deslignificações superiores a 94 %, tanto para *EAH6/EA-US 0,5* quanto para o *EAH/EA 0,5*. Entretanto, valores inferiores de deslignificação foram obtidos ao ser empregado 0,1 g de NaOH g<sup>-1</sup> substrato seco, que foram de 20,7 e 33,6 % para *EAH6/EA 0,1* e *EAH6/EA-US 0,1*, respectivamente. No caso das recuperações de glucanas, valores superiores foram observados para 0,1 g de NaOH g<sup>-1</sup> substrato seco quando comparado ao uso de 0,5 g de NaOH g<sup>-1</sup>, indicando a solubilização parcial dessas em soluções alcalinas mais concentradas.

**Tabela 11.** Rendimento mássico, recuperação de glucana e deslignificação dos substratos pré-tratados.

| Condições             | Recuperação mássica (%) | Recuperação de glucana (%) | Recuperação de lignina (%)* |
|-----------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <i>EAH6</i>           | 61,4                    | 61,4                       | -                           |
| <i>EAH6/EA 0,1</i>    | 85,8                    | 59,7                       | 79,3 (20,7)                 |
| <i>EAH6/EA-US 0,1</i> | 89,7                    | 60,9                       | 66,4 (33,6)                 |
| <i>E/EA 0,1</i>       | 68,7                    | 96,0                       | 92,1 (7,9)                  |
| <i>E/EA-US 0,1</i>    | 78,7                    | 97,3                       | 86,3 (13,7)                 |
| <i>EAH6/EA 0,5</i>    | 78,4                    | 54,9                       | 5,7 (94,3)                  |
| <i>EAH6/EA-US 0,5</i> | 71,9                    | 41,9                       | 5,6 (94,4)                  |
| <i>E/EA 0,5</i>       | 89,9                    | 89,4                       | 83,5 (16,5)                 |
| <i>E/EA-US 0,5</i>    | 87,7                    | 85,8                       | 87,2 (12,8)                 |

E = eucalipto; AH6 = auto-hidrólise condição 6; EA = extração alcalina ; US = ultrassom

\* Valores entre parênteses representam a quantidade de lignina removida (deslignificação).

Ao ser avaliada a ação do ultrassom sobre a deslignificação, foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa na extração para o uso do pré-tratamento combinado, especialmente quando empregado 0,5 g de NaOH

g<sup>-1</sup> substrato seco, que aumentou a remoção de lignina em apenas 0,12 pontos percentuais. Os experimentos onde o eucalipto foi diretamente extraído com álcali (E/EA 0,1 e 0,5 na ausência ou presença de US) foram realizados como controle e neles observou-se alguma perda de massa, aparentemente devida à extração de frações mais acessíveis da lignina que estão presentes na lamela média.

A composição química dos substratos pré-tratados a vapor e deslignificados em meio alcalino estão ilustradas na **Tabela 12**. Novamente, para todos os materiais obtidos, o conteúdo de celulose foi maior se comparado aos materiais *in natura*, sendo os maiores teores para o EAH6/EA e o EAH6/EA-US tanto com 0,1 quanto 0,5 g de NaOH na extração alcalina. Houve uma grande diminuição do teor de lignina quando empregado a deslignificação alcalina, entretanto a maior variação foi para o pré-tratamento combinado (EAH6/EA 0,5 e EAH6/EA-US 0,5), que decaiu de 35,8 para aproximadamente 3,9 % em média. Esta remoção de lignina aumenta a acessibilidade química da celulose, que pode ser atribuída a um aumento na área superficial (Carvalho et al., 2015) ou no grau de inchamento (Cardona et al., 2010) das fibras de celulose.

**Tabela 12.** Composição química dos substratos produzidos a partir do eucalipto.

| Condições      | AnGlc <sup>1</sup> | AnXyl <sup>2</sup> | Grupo acetila    | Lignina total | Lignina solúvel | Lignina insolúvel |
|----------------|--------------------|--------------------|------------------|---------------|-----------------|-------------------|
| EAH6           | 59,4 ± 1,2         | 1,2 ± 1,1          | and <sup>3</sup> | 35,8 ± 1,8    | 1,6 ± 0,2       | 34,2 ± 1,6        |
| EAH6/EA 0,1    | 83,0 ± 2,6         | 7,1 ± 0,4          | and              | 4,2 ± 0,1     | 0,1 ± 0,0       | 4,1 ± 0,1         |
| EAH6/EA-US 0,1 | 84,7 ± 0,3         | 7,5 ± 0,3          | and              | 6,5 ± 1,9     | 0,1 ± 0,0       | 6,4 ± 1,9         |
| E/EA 0,1       | 44,8 ± 1,0         | 11,6 ± 0,8         | 1,2 ± 0,2        | 23,4 ± 2,0    | 0,2 ± 0,0       | 23,2 ± 2,0        |
| E/EA-US 0,1    | 46,4 ± 3,4         | 11,8 ± 2,4         | 1,51 ± 0,5       | 18,7 ± 2,8    | 0,2 ± 0,0       | 18,5 ± 2,8        |
| EAH6/EA 0,5    | 90,8 ± 0,8         | 3,6 ± 0,0          | and              | 3,5 ± 0,1     | 0,1 ± 0,0       | 3,5 ± 0,1         |
| EAH6/EA-US 0,5 | 89,6 ± 0,1         | 3,9 ± 0,4          | and              | 4,4 ± 0,9     | 0,1 ± 0,0       | 4,4 ± 0,9         |
| E/EA 0,5       | 46,6 ± 0,9         | 12,7 ± 0,9         | 1,2 ± 0,1        | 23,4 ± 0,9    | 0,1 ± 0,0       | 23,3 ± 0,9        |
| E/EA-US 0,5    | 45,8 ± 0,6         | 14,1 ± 0,1         | 1,1 ± 0,0        | 25,0 ± 0,6    | 0,1 ± 0,0       | 24,9 ± 0,6        |

E = eucalipto; AH6 = auto-hidrólise condição EAH6; EA = extração alcalina ; US = ultrassom

<sup>1</sup> O percentual de hidroximetilfurfural detectado no ensaio foi expresso como equivalentes de glucose;

<sup>2</sup> O percentual de furfural detectado no ensaio foi expresso como equivalentes de xilose;

<sup>3</sup> Abaixo do nível de detecção;

Os substratos gerados pelo pré-tratamento alcalino tiveram seus açúcares neutros e ácidos urônicos também determinados por metanólise ácida (**Tabela 13**). Esses dados indicam que ao empregar extração alcalina após a explosão a vapor, ocorre solubilização das hemiceluloses com praticamente o desaparecimento de ácido 4-O-metil-glucurônico e galactose. No caso da xilose, nota-se um leve decaimento após o processo combinado, onde para *EAH* com 9,6 e após extração *EAH6/EA* e *EAH6/EA-US* foram de 6,3 a 8,3 g g<sup>-1</sup> massa seca, respectivamente. Entretanto, todos os valores de glucose foram superiores aos do material explodido a vapor, indicando maior exposição da celulose após estes pré-tratamentos.

Substratos explodidos a vapor e deslignificados com 0,1 g de NaOH g<sup>-1</sup> substrato seco apresentaram um efeito marginal de deslignificação e pouca influência sobre a composição química do material de origem. Por essa razão, optou-se por estender os estudos de hidrólise enzimática e de deslignificação dos demais pontos do planejamento fatorial empregando apenas a condição de 0,5 g NaOH g<sup>-1</sup> substrato seco.

O pré-tratamento alcalino é conhecido por desestruturar o tecido vegetal pela remoção da lignina e complexos lignina-carboidrato presentes na lamela média e na parede primária, gerando perda de coesão entre as fibras. Quando exposta a soluções alcalinas, particularmente sob altas temperaturas, a lignina pode sofrer uma série de reações levando à sua dissolução e essas reações ocorrem pela quebra das ligações aril-éter entre as unidades fenilpropanóides, formando grupos fenólicos que facilitam a sua solubilização (Sanyer, Chidester, 1963). Posteriormente, ocorre a deslignificação da parede secundária, resultando em perdas na resistência mecânica da fibra e no aumento da acessibilidade da celulose (Rezende et al., 2011).

Como apresentado na **Figura 30**, a extração alcalina não aumentou o rendimento de hidrólise enzimática dos substratos celulósicos, apesar dos altos valores de deslignificação de 94,4 % para o *EAH6/EA-US* e de 94,3 % para o *EAH/EA*. Na verdade, houve diminuição da conversão da celulose em EqGlc para o substrato auto-hidrolisado seguido de extração alcalina e isto foi inicialmente atribuído à diminuição da relação enzima/substrato, já que a cargas enzimáticas utilizadas nesses experimentos foram aplicadas em relação ao teor de sólidos totais, sem considerar o teor de glucanas presente nos materiais pré-tratados. De acordo com o teste t de Student, os valores de conversão para 96 h foram todos distintos entre si, com exceção do material somente extraído com álcali, que não ultrapassou 0,9 % de

conversão. Este baixo valor de conversão foi devido ao fato dessa extração ter sido feita diretamente no cavaco de eucalipto, sendo que esse controle apresentou pouca ou nenhuma acessibilidade na etapa de hidrólise enzimática.

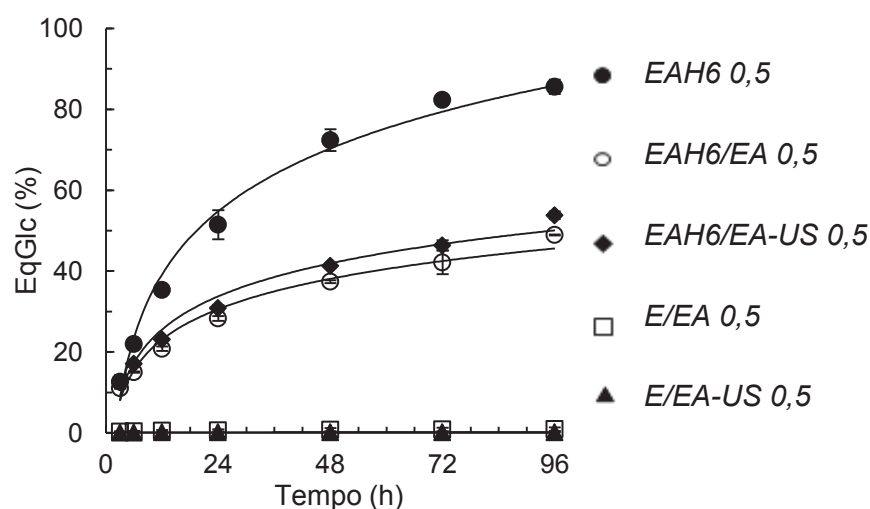
**Tabela 13.** Metanólise dos eucaliptos pré-tratados a vapor e designificação alcalina em g g<sup>-1</sup> massa seca.

| Condições             | Xilose   | Ácido 4-O-metil-glucurônico | Manose   | Galactose        | Glucose   |
|-----------------------|----------|-----------------------------|----------|------------------|-----------|
| <i>EAH6</i>           | 9,6 ±1,1 | 3,2 ±0,3                    | 1,2 ±0,2 | and <sup>1</sup> | 25,2 ±1,9 |
| <i>EAH6/EA 0,1*</i>   | 7,9 ±0,1 | and <sup>1</sup>            | 1,0 ±0,0 | and              | 35,5 ±0,1 |
| <i>EAH6/EA-US 0,1</i> | 8,5 ±1,9 | and                         | 1,0 ±0,1 | and              | 39,5 ±3,1 |
| <i>EAH6/EA 0,5</i>    | 8,0 ±0,1 | and                         | 1,1 ±0,0 | and              | 39,7 ±0,2 |
| <i>EAH6/EA-US 0,5</i> | 8,5 ±1,9 | 1,9 ±2,6                    | 1,0 ±0,1 | 0,7 ±1,0         | 39,5 ±3,2 |
| <i>E/EA 0,5</i>       | 6,3 ±1,7 | 1,9 ±1,2                    | 0,8 ±0,0 | and              | 34,0 ±0,2 |
| <i>E/EA-US 0,5</i>    | 8,3 ±1,1 | and                         | 1,2 ±0,3 | and              | 42,7 ±9,2 |

E = eucalipto; AH6 = auto-hidrólise condição EAH6; EA = extração alcalina; US = ultrassom;

\* 0,1 e 0,5 = quantidade (em g) de NaOH g<sup>-1</sup> substrato seco empregado na designificação alcalina.;

<sup>1</sup> Abaixo do nível de detecção.

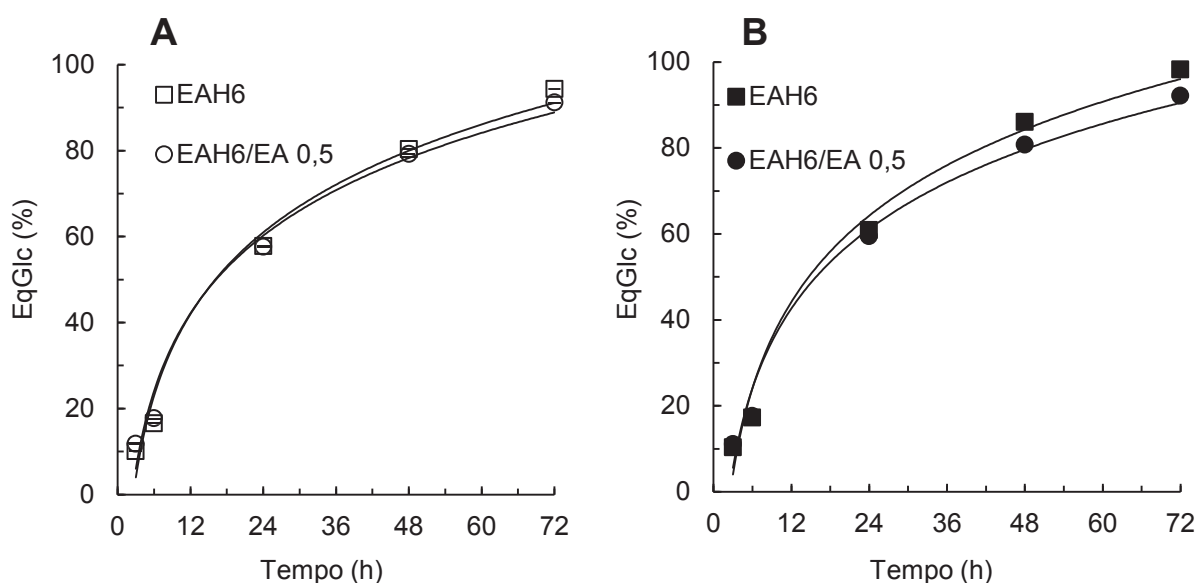


**Figura 30.** Perfil de hidrólise enzimática dos substratos derivados do pré-tratamento de cavacos de eucalipto por explosão a vapor (EAH6), pelo processo combinado de explosão a vapor seguido de extração alcalina (EAH6/EA) e somente extraído com álcali (E/EA), obtidos na ausência e presença de ultrassom (US) (0,5 = quantidade (em g) de NaOH g<sup>-1</sup> substrato seco empregado na designificação alcalina).



Lima et al. (2013) também realizaram um pré-tratamento combinado, porém, com HCl diluído seguido de extração com NaOH empregando *E. grandis*. Ao hidrolisar este material pré-tratado com 25 FPU de Accellerase 1500  $\text{g}^{-1}$  substrato, suplementado com 12,5 BGU de Novozym 188  $\text{g}^{-1}$  substrato, obtiveram 65,4 % de conversão após 48 h de hidrólise. Estes valores de conversão são similares ao obtidos neste trabalho, entretanto, o tipo de enzima foi diferente e a carga enzimática empregada por estes autores foi superior à deste estudo (7 FPU  $\text{g}^{-1}$  substrato).

Novos experimentos foram realizados para avaliar os rendimentos de hidrólise sob a mesma carga enzimática em relação ao teor de glucanas, já que há diferenças significativas na composição química desses substratos celulósicos (59,4 % e 90,8 % de glucanas para EAH6 e EAH6/EA, respectivamente) (**Figura 31**). Assim, observou-se que quando empregada mesma razão enzima/substrato, os dois materiais apresentaram comportamento similares, em torno de 95 % de conversão em 72 h, indicando a não necessidade de realizar a deslignificação alcalina para atingir altos valores de conversão.



**Figura 31.** Perfis de hidrólise enzimática de eucalipto explodido a vapor (EAH6) e explodido a vapor seguido de extração alcalina (EAH6/EA) empregando 33 mg de Cellic CTec3  $\text{g}^{-1}$  celulose, (**A**) mantendo sólidos totais fixo com variação da carga enzimática e (**B**) com a mesma carga enzimática variando o teor de sólidos totais (0,5 = quantidade (em g) de NaOH  $\text{g}^{-1}$  substrato seco empregado na deslignificação alcalina).

A deslignificação alcalina sem ultrassom foi então realizada em todas as condições do planejamento fatorial de explosão a vapor empregando cavacos de eucalipto e os dados obtidos de rendimento e recuperação estão apresentados na **Tabela 14**. Os valores de recuperação mássica ficaram entre 52,8 e 72,9 % para os pontos do vértice, e entre 69,2 e 96,8 % para os pontos axiais. Já no caso do ponto central os valores de recuperação mássica foram de 70,9 e 76,1 % na ausência e presença de ultrassom, respectivamente. Em relação à deslignificação, os materiais que apresentaram os menores teores de lignina após o pré-tratamento foram as condições *EAH7/EA* e *EAH11/EA*, com remoção acima de 70 %.

**Tabela 14.** Rendimento mássico, recuperação de celulose e deslignificação dos substratos de eucalipto produzidos a partir das condições do planejamento fatorial.

| Condições       | Recuperação mássica (%) | Recuperação de celulose (%) | Recuperação de lignina (%)* |
|-----------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>PC/EA</i>    | 76,1                    | 55,0                        | 40,7 (59,3)                 |
| <i>EAH4/EA</i>  | 58,6                    | 71,6                        | 37,2 (62,8)                 |
| <i>EAH5/EA</i>  | 72,4                    | 66,5                        | 43,3 (56,7)                 |
| <i>EAH6/EA</i>  | 72,9                    | 53,1                        | 16,6 (83,4)                 |
| <i>EAH7/EA</i>  | 52,8                    | 49,3                        | 7,8 (92,2)                  |
| <i>EAH8/EA</i>  | 76,7                    | 63,6                        | 45,9 (54,1)                 |
| <i>EAH9/EA</i>  | 69,2                    | 66,5                        | 43,1 (56,9)                 |
| <i>EAH10/EA</i> | 68,9                    | 55,5                        | 36,4 (63,6)                 |
| <i>EAH11/EA</i> | 69,6                    | 49,8                        | 24,4 (75,6)                 |

E = eucalipto; AH = auto-hidrólise; EA = extração alcalina

\* Valores entre parênteses representam a quantidade de lignina removida (deslignificação).

Após este pré-tratamento combinado, as amostras foram analisadas e a composição química obtida indicou que o material com menor teor de lignina e anidroglicose foi o *EAH7/EA* e *EAH7/EA-US*, que apresentaram 5,2-5,7 e 86,8-87,5 %, respectivamente (**Tabela 15**). Por outro lado, os substratos *EAH5/EA*, *EAH6/EA*, *EAH7/EA* e *EAH11/EA* apresentaram teores de glicose acima de 70 %.

Para uma melhor compreensão dos efeitos da extração alcalina, os dados da **Tabela 16** foram comparados com os dados de metanólise apresentados na **Tabela 7**

referentes aos materiais obtidos após explosão a vapor em diferentes condições. Sendo assim, foi possível observar que não houve presença de arabinose e ácido galacturônico quando realizada explosão a vapor seguida da extração alcalina, e que houve uma redução significativa dos teores de ácido 4-O-metil-glucurônico e ramnose, estando esses ausentes nas condições de maior severidade (*EAH6/EA*, *EAH6/EA-US*, *EAH7/EA-US*, *EAH7/EA-US*, *EAH11/EA* e *EAH11/EA-US*). Já para as condições *EAH4*, *EAH8* e *PC*, observou-se uma diminuição de 42, 53 e 87 % nos teores de ácido 4-O-metil-glucurônico nos produtos de metanólise, respectivamente, tanto na ausência quanto na presença de *US*.

**Tabela 15.** Composição química de substratos deslignificados derivados de *E. urograndis* nativo e explodido a vapor nas condições do planejamento fatorial após de extração alcalina com e sem auxílio do ultrassom.

| Condições       | AnGlc <sup>1</sup>   | AnXyl <sup>2</sup>  | Lignina solúvel     | Lignina insolúvel    | Total |
|-----------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-------|
| <i>PC/EA</i>    | 69,1 <sup>±1,0</sup> | 5,9 <sup>±1,0</sup> | 0,1 <sup>±0,1</sup> | 18,3 <sup>±1,2</sup> | 93,6  |
| <i>EAH4/EA</i>  | 66,6 <sup>±1,0</sup> | 6,1 <sup>±0,1</sup> | 0,2 <sup>±0,0</sup> | 17,7 <sup>±0,1</sup> | 90,4  |
| <i>EAH5/EA</i>  | 71,4 <sup>±0,8</sup> | 5,9 <sup>±0,3</sup> | 0,1 <sup>±0,0</sup> | 18,2 <sup>±0,4</sup> | 95,5  |
| <i>EAH6/EA</i>  | 73,9 <sup>±1,5</sup> | 4,4 <sup>±0,3</sup> | 0,1 <sup>±0,0</sup> | 9,1 <sup>±1,8</sup>  | 87,5  |
| <i>EAH7/EA</i>  | 86,8 <sup>±1,9</sup> | 4,9 <sup>±0,8</sup> | 0,1 <sup>±0,0</sup> | 5,2 <sup>±1,1</sup>  | 97,0  |
| <i>EAH8/EA</i>  | 56,0 <sup>±0,6</sup> | 7,1 <sup>±0,2</sup> | 0,3 <sup>±0,0</sup> | 21,9 <sup>±1,3</sup> | 85,3  |
| <i>EAH9/EA</i>  | 63,4 <sup>±1,1</sup> | 6,9 <sup>±0,2</sup> | 0,2 <sup>±0,0</sup> | 18,6 <sup>±1,8</sup> | 89,1  |
| <i>EAH10/EA</i> | 67,7 <sup>±0,2</sup> | 6,9 <sup>±0,3</sup> | 0,1 <sup>±0,0</sup> | 17,9 <sup>±0,4</sup> | 92,6  |
| <i>EAH11/EA</i> | 73,9 <sup>±1,0</sup> | 5,0 <sup>±0,2</sup> | 0,1 <sup>±0,0</sup> | 12,4 <sup>±1,7</sup> | 91,4  |

E = eucalipto; AH = auto-hidrólise; EA = extração alcalina

<sup>1</sup> Percentual de hidroximetilfurfural está expresso como equivalentes de anidrogucose;

<sup>2</sup> Percentual de furfural está expresso como equivalentes de anidroxilose;

As presenças de xilose, manose e galactose também foram reduzidas significativamente nos produtos de metanólise, sendo que as maiores diminuições no teor de xilose foram correspondentes a 83, 80, 60 e 62 % para as condições *EAH9*, *PC*, *EAH4* e *EAH5*, respectivamente. Em contrapartida, houve aumento no teor de glucose para todas as condições de pré-tratamento, alcançando valores acima 45 g g<sup>-1</sup> para as condições de maior severidade na explosão a vapor.

**Tabela 16.** Metanólise em  $\text{g g}^{-1}$  massa seca das condições do planejamento fatorial do *E. urograndis* após extração com e sem auxílio do ultrassom.

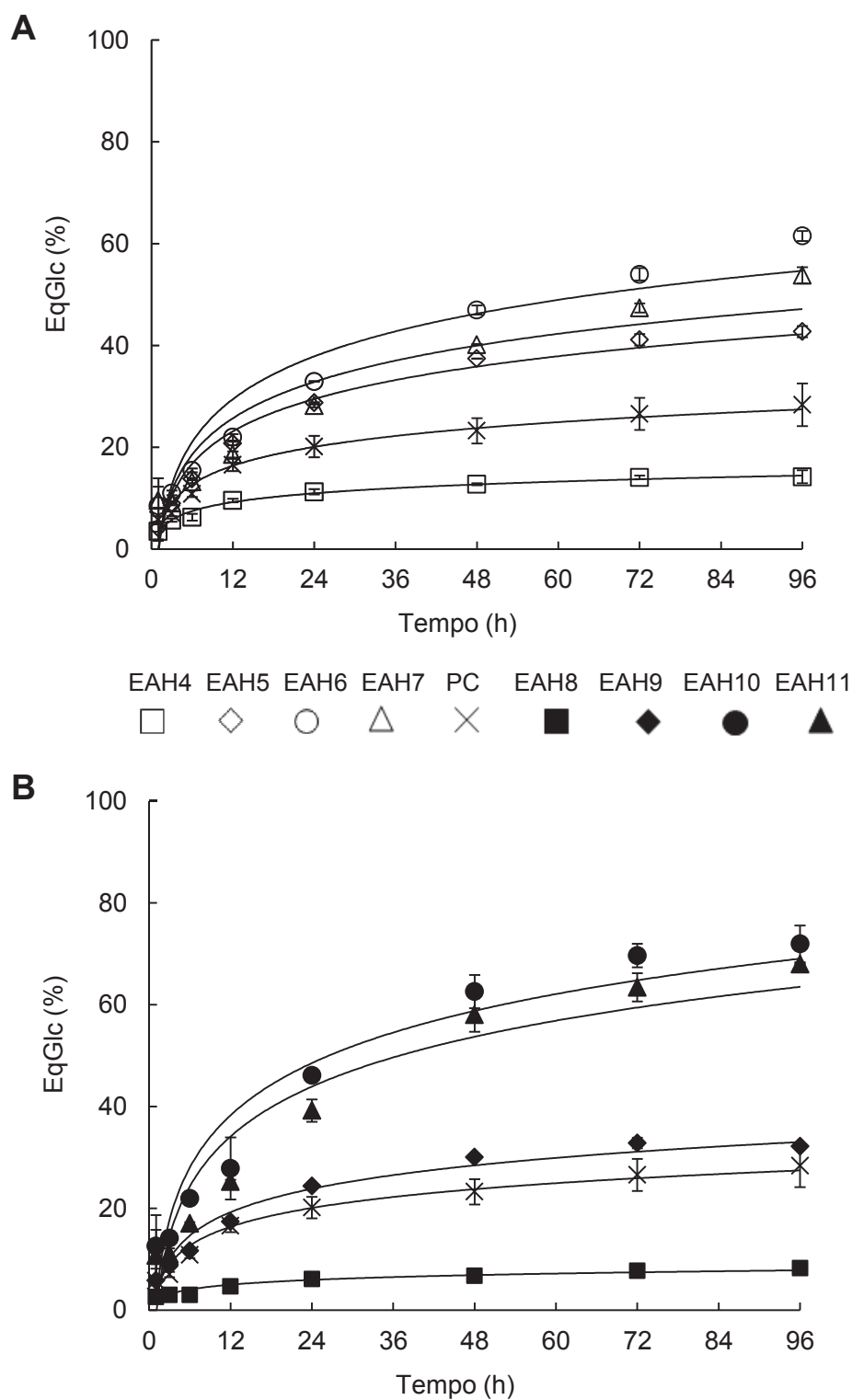
| Comp.    | Ramnose       | Xilose         | Ácido 4-O-metil-glucurônico | Manose        | Galactose     | Glucose        |
|----------|---------------|----------------|-----------------------------|---------------|---------------|----------------|
| PC/EA    | and           | 10,0 $\pm$ 2,0 | 2,3 $\pm$ 0,6               | 2,0 $\pm$ 0,6 | and           | 32,2 $\pm$ 0,3 |
| EAH4/EA  | 0,4 $\pm$ 0,0 | 12,0 $\pm$ 0,2 | 6,6 $\pm$ 0,3               | 2,0 $\pm$ 0,3 | 1,1 $\pm$ 0,0 | 47,1 $\pm$ 5,6 |
| EAH5/EA  | and           | 10,7 $\pm$ 0,1 | 4,2 $\pm$ 0,1               | 1,6 $\pm$ 0,2 | and           | 29,8 $\pm$ 0,2 |
| EAH6/EA  | and           | 5,3 $\pm$ 0,2  | and                         | 0,8 $\pm$ 0,0 | and           | 53,5 $\pm$ 2,0 |
| EAH7/EA  | and           | 2,6 $\pm$ 0,7  | and                         | 0,6 $\pm$ 0,1 | and           | 50,2 $\pm$ 2,9 |
| EAH8/EA  | 0,8 $\pm$ 0,0 | 23,3 $\pm$ 0,3 | 14,1 $\pm$ 0,4              | 2,6 $\pm$ 0,5 | 1,7 $\pm$     | 28,2 $\pm$ 0,3 |
| EAH9/EA  | and           | 6,6 $\pm$ 0,1  | 1,5 $\pm$ 2,1               | 0,8 $\pm$ 0,3 | and           | 31,6 $\pm$ 0,1 |
| EAH10/EA | 0,4 $\pm$ 0,0 | 15,0 $\pm$ 1,9 | 7,8 $\pm$ 1,1               | 2,1 $\pm$ 0,0 | 1,2 $\pm$ 0,1 | 33,2 $\pm$ 0,2 |
| EAH11/EA | and           | 10,3 $\pm$ 1,0 | and                         | 1,3 $\pm$ 0,1 | and           | 50,2 $\pm$ 0,1 |

E = eucalipto; AH = auto-hidrólise; EA = extração alcalina; and = abaixo do nível de detecção.

Os substratos gerados por deslignificação alcalina foram então submetidos à hidrólise enzimática empregando 33 mg de Cellic CTec3  $\text{g}^{-1}$  de celulose e as maiores conversões foram observadas para EAH6/EA, EAH10/EA e EAH11/EA (**Figura 32**), com valores de acima de 61,5; 68,0 e 71,9 %, respectivamente. Isto demonstra que, no caso do pré-tratamento combinado, existe a possibilidade de se utilizar uma condição mais branda de explosão a vapor (EAH10), com fator de severidade de 3,84, ao invés da condição EAH6 com severidade 3,94.

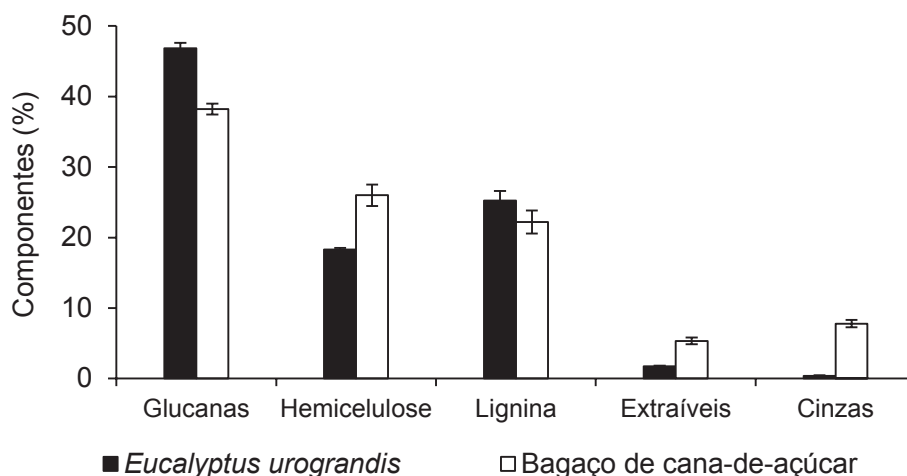
#### 4.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM ALTO TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS

Na **Figura 33** é possível observar as diferenças nos valores de glucanas, hemicelulose, lignina total, extraíveis e cinzas entre eucalipto e bagaço de cana, ambos *in natura*. Como já dito, o eucalipto apresentou 1,7 % de extraíveis, resultando em substrato com 46,8 % de glucanas, 18,3 % de hemiceluloses, 25,2 % de lignina total e 0,4 % de cinzas. Já para o bagaço, a extração com água seguida de etanol removeu 5,3 % de extraíveis, sendo 53,5 % deste valor proveniente da extração com água e 46,5 % da extração alcoólica, gerando assim um substrato com 38,2 % de glucanas, 26,0 % de hemiceluloses, 22,2 % de lignina total e 7,8 % de cinzas.



**Figura 32.** Valores de conversão de equivalentes glucose (%) em diferentes tempos para a hidrólise enzimática das condições do planejamento fatorial do *E. urograndis* após extração (marcador sem preenchimento = vértices do cubo, preenchidos = pontos axiais e x = ponto central do delineamento fatorial, PC = ponto central; EAHx = eucalipto auto-hidrólise em diferentes condições de tempo e temperatura).

As diferenças observadas no conteúdo de glucanas e hemiceluloses foram coerentes com os dados disponíveis na literatura para folhosas e gramíneas. Pinto et al. (2005) demonstraram que cavacos de *E. globulus* contêm 53,4 % de glucanas, 17,5 % de hemiceluloses, 22,1 % lignina total e 1,7 % de extraíveis. Por outro lado, Rocha et al. (2012) e Pitarelo et al. (2012) apresentaram valores entre 39,3 e 43,1 % de glucanas, 21,3 e 25,2 % de hemiceluloses, 22,9 e 28,6 % de lignina total e 4,3 e 6,7 % extraíveis para o bagaço de cana. A porcentagem de extraíveis é geralmente superior em gramíneas pela presença de grandes quantidades de metabólitos secundários (Klock, 2006). Já o alto teor de cinzas observado em gramíneas pode estar relacionado à contaminação parcial com solo, fato inevitável particularmente quando o processo de colheita é totalmente mecanizado (Braunbeck et al., 2003).

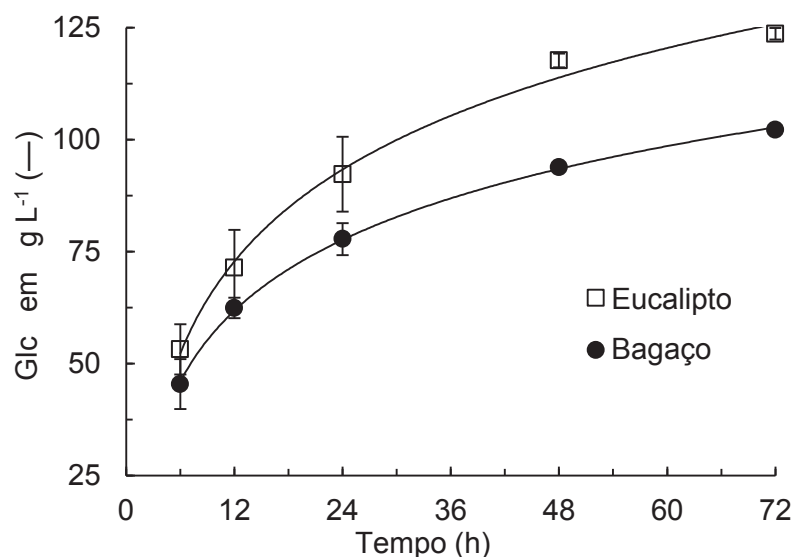


**Figura 33.** Comparação da composição química de amostras *in natura* de cavacos de *E. urograndis* e bagaço de cana-de-açúcar.

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado em apenas uma condição experimental (195 °C por 7,5 min), oriunda de estudos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa (Pitarelo et al., 2016). Este pré-tratamento a vapor foi realizado novamente nestas condições e o rendimento de recuperação total foi de 78,2 %, dos quais 64,0 % referentes à fração insolúvel e 14,2 % à fração solúvel em água. Tais valores de recuperação foram semelhantes aos obtidos anteriormente nos estudos de pré-otimização, demonstrando que o reator foi capaz de reproduzir estas condições experimentais. O material obtido apresentou 2,7 % de anidroxilose, 46,5 % de anidroglicose e 36,7 % de lignina total.

Com relação à hidrólise enzimática do eucalipto e do bagaço de cana-de-açúcar ambos explodidos a vapor, observa-se na **Figura 34** que os valores de conversão em EqGlc (%) foram de aproximadamente 95 % para os dois casos. Nota-se que apesar do perfil ser semelhante, a conversão de glucanas em açúcares livres foi maior para o eucalipto do que para o bagaço, sendo a concentração final obtida de 124 e 102 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, sempre tendo a celobiose como um componente minoritário dos hidrolisados obtidos (menor que 3 %).

Ramos et al. (2015) realizaram a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor na presença de 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> bagaço seco. O pré-tratamento foi realizado por 10 min a 180 °C e a hidrólise enzimática foi feita empregando 62,5 mg g<sup>-1</sup> celulose e 20% de sólidos totais. As concentrações de glucose após 24 e 72 h de reação foram de 29,7 e 54,0 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Já no presente trabalho, foram obtidas 48 e 64 g L<sup>-1</sup> de glucose nos mesmos tempos de reação e na mesma quantidade de sólidos totais. Porém, neste caso, vale ressaltar que as condições de pré-tratamento foram diferentes e que o presente trabalho empregou explosão a vapor sem adição de um catalisador ácido exógeno.



**Figura 34.** Conversão em equivalentes de glucose (g L<sup>-1</sup>) durante a hidrólise enzimática de substratos pré-tratados a vapor empregando Cellic CTec3.

Alguns autores já conseguiram concentrações maiores de equivalentes de glucose na hidrólise enzimática de substratos pré-tratados em altos teores de sólidos totais. Por exemplo, Zhang et al. (2009) produziram 158 g L<sup>-1</sup> de glucose em 48 h de



hidrólise utilizando Celluclast 1,5 L e Novozym 188 em reações com 20 % de sólidos totais. No entanto, o substrato utilizado possuía cerca de 90 % de celulose e menos de 3 % de lignina, o que representa menor barreira estrutural frente à ação sinérgica das endo e exoglucanases.

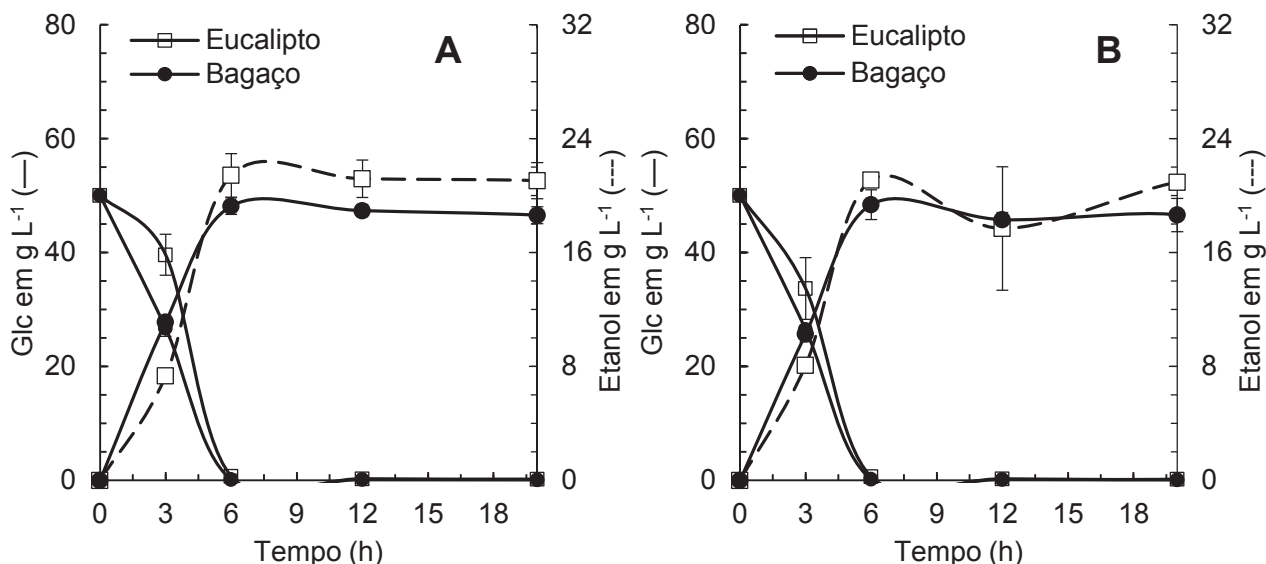
Em outro estudo, Gao et al. (2014) hidrolisaram com Cellic CTec2 amostras de bagaço de cana deslignificados em meio alcalino cujo teor de lignina era de 8,9 %. A hidrólise foi realizada com consistência (sólidos totais) inicial de 12 % e alimentação com 7 % adicionais em 6, 12 e 24 h para atingir uma consistência final de 33 % em Erlenmeyer de 250 mL. A adição de enzima foi realizada somente no início do processo e, após 72 h de reação, um total de  $109,2 \text{ g L}^{-1}$  de glucose foi obtido, que aumentou para  $129,5 \text{ g L}^{-1}$  quando a reação se estendeu até 120 h. Estes resultados empregando substratos provenientes do processo de deslignificação são semelhantes aos obtidos nesse trabalho para substratos explodidos a vapor e hidrolisados na presença de um alto teor de lignina.

A hidrólise enzimática convencional é geralmente realizada com sólidos totais abaixo de 5 %, o que resulta em concentrações de açúcar menores do que 5 % no hidrolisado e, conseqüentemente, em concentrações finais de etanol menores que 2 % ( $\text{m m}^{-1}$ ) após a fermentação (Qin, 2010). De acordo com Wingren et al. (2003), aumentar de 5 para 8 % de sólidos totais pode reduzir em torno de 20 % os custos de produção de etanol e um aumento superior resultaria em reduções ainda mais significativas. Sendo assim, realizar a etapa de hidrólise enzimática em alta consistência (acima de 15 % de sólidos totais) aumenta as concentrações de glucose e etanol e diminui os custos operacionais e de capital, bem como o consumo de energia durante a destilação para recuperação do produto (Modenbach e Nokes, 2013).

#### 4.4 PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO COM DIFERENTES LEVEDURAS

Os ensaios de fermentação com diferentes leveduras foram realizados empregando hidrolisados dos dois substratos. Este ensaio teve concentração inicial de glucose de  $50 \text{ g L}^{-1}$  e alcançaram 21,4 e  $19,2 \text{ g L}^{-1}$  de etanol quando empregada a Thermosacc Dry (**Figura 35A**), correspondendo a 84 e 75,5 % de eficiência para eucalipto e bagaço, respectivamente. Da mesma forma, ao utilizar CAT-1, os valores

de produção de etanol foram de 21,1 e 19,4 g L<sup>-1</sup> de etanol e de 82,7 e 75,9 % de eficiência para eucalipto e bagaço, respectivamente (**Figura 35B**).

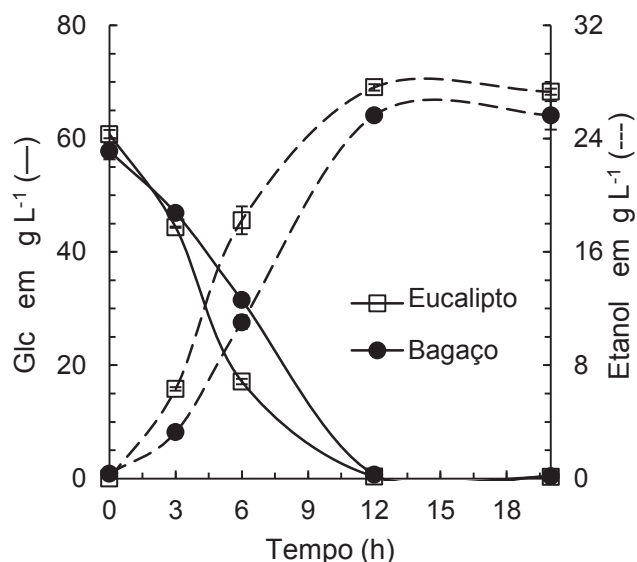


**Figura 35.** Gráficos de consumo de glucose (g L<sup>-1</sup>) e produção de etanol (g L<sup>-1</sup>) a partir dos hidrolisados enzimáticos utilizando (A) Thermosacc Dry e (B) CAT-1.

Como as eficiências de fermentação foram equivalentes, ensaios comprobatórios foram realizados empregando somente a levedura Thermosacc Dry. Esses novos ensaios foram realizados com concentrações iniciais de glucose ligeiramente diferentes, de 58 g L<sup>-1</sup> para o bagaço e de 60 g L<sup>-1</sup> para o eucalipto (**Figura 36**). No final deste processo, diferentes concentrações de etanol e rendimentos de processo foram obtidas, alcançando 25,6 g L<sup>-1</sup> de etanol com 87,1 % de eficiência e 27,3 g L<sup>-1</sup> de etanol com 88,1 % de eficiência para os substratos derivados de bagaço e eucalipto, respectivamente.

Em ambos os casos, foi possível observar que toda a glucose foi consumida a partir de 12 h, sugerindo que o processo pode ser finalizado neste tempo sem qualquer perda de eficiência. Em 12 h de fermentação, os valores de produtividade atingiram 2,1 e 2,3 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> de etanol, respectivamente. Entretanto, observou-se um aumento do tempo para consumo total de glucose em relação ao ensaio anterior, realizado com concentração inicial de glucose ligeiramente inferior (**Figura 35**). Esse resultado pode estar associado ao emprego de apenas 1 g L<sup>-1</sup> de levedura no ensaio,

enquanto normalmente se utilizam concentrações bem superiores (Rana et al., 2014; Moraes et al., 2016).



**Figura 36.** Consumo de glucose (g L<sup>-1</sup>) e produção de etanol (g L<sup>-1</sup>) a partir dos hidrolisados enzimáticos utilizando a levedura *Thermosacc Dry*.

Martins et al. (2015) fermentaram hidrolisados contendo 60 g L<sup>-1</sup> de glucose usando uma estirpe industrial de *S. cerevisiae* e alcançaram 1,6 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> de etanol em 16 h com uma eficiência de 84,5 %. Entretanto, o substrato foi derivado de bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino. Já no caso de eucalipto, McIntosh et al. (2012) pré-trataram cavacos de *E. dunnii* com radiação de micro-ondas e, após hidrólise enzimática com Cellic CTec2, o substrato foi fermentado com *S. cerevisiae* ATCC 58447. Os autores iniciaram a fermentação com 38 g L<sup>-1</sup> de glucose e a concentração de etanol obtida foi de 18 g L<sup>-1</sup>, o que representa uma eficiência de 92 % após 30 h de fermentação.

Romaní et al. (2014) produziram etanol celulósico a partir de substratos derivados de *E. globulus* por auto-hidrólise, onde o reator foi aquecido a 210 °C e, ao alcançar a temperatura, o sistema de aquecimento foi desativado e resfriado até a temperatura ambiente, totalizando aproximadamente 50 min de pré-tratamento. Após sacarificação e fermentação simultânea (SSF) do material resultante, empregando Cellic CTec2 e *S. cerevisiae* PE-2, obteve-se a produtividade de 0,63 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> após 72 h, com eficiência de fermentação de 94,7 %. Os autores realizaram também 24 h

de pré-hidrólise antes da sacarificação e fermentação simultânea (pSSF), alcançando  $0,55 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e 92,1 % de produtividade e eficiência, respectivamente. Como o pSSF geralmente atinge valores de produtividade maiores que SSF (Hoyer et al., 2013; Liu et al., 2014), estes valores inesperados podem ter sido devido à presença de inibidores no meio de fermentação. Em contrapartida, Neves et al. (2016), ao empregar bagaço de cana explodido a vapor e lavado com água ( $195^\circ\text{C}$  por 7,5 min) para produção de etanol celulósico, alcançou com pSSF a mesma concentração de etanol do SSF na metade do tempo de processamento, atingindo valores de 0,39 e  $0,53 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Entretanto, estes resultados foram obtidos na ausência de inibidores de fermentação usando Cellic CTec2 e Thermossac Dry. Na configuração de SHF empregado no presente estudo, o tempo de conversão total, tanto para bagaço quanto para eucalipto, foi de 84 h (72 h de hidrólise e 12 h de fermentação); portanto, a produção de etanol correspondente foi de 0,31 e  $0,33 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. No entanto, estes valores não podem ser comparados com os descritos acima, pois a estratégia de fermentação foi completamente diferente.

Quando os resultados obtidos neste trabalho foram projetados para 1 ton (1000 kg) de biomassa processada, pode-se concluir que o eucalipto foi a biomassa com maior potencial de produção de etanol de segunda geração, conforme indicado na **Tabela 17**. As projeções foram calculadas considerando o rendimento de recuperação da fração do material pré-tratado e lavado com água, a quantidade de glucose obtida após a hidrólise enzimática e a correspondente eficiência de fermentação para produção de etanol. Os cavacos de eucalipto apresentaram maior susceptibilidade à hidrólise enzimática, gerando 17 % mais glucose que o bagaço depois de 72 h de hidrólise; sendo assim, apresentaram um potencial de produção de 218,5 e  $178 \text{ L t}^{-1}$  de etanol, respectivamente. Estes números são consideravelmente altos se comparados com a quantidade teórica de etanol que pode ser produzida do bagaço e do eucalipto, ambos explodidos a vapor e lavados com água, cuja máxima eficiência de fermentação produziria 204,4 e  $248 \text{ L t}^{-1}$  etanol, respectivamente. Entretanto, é importante mencionar que 7,1 t de cana são necessários para produzir 1 t de bagaço de cana seco (Oliveira et al., 2013; Carvalho et al., 2015).

Gonzalez et al. (2011) realizaram uma análise econômica da produção de etanol celulósico a partir de biomassa de eucalipto e a rentabilidade do processo foi mais sensível ao custo da biomassa, seguido da concentração de carboidrato na biomassa e do custo da enzima. Com relação ao custo da biomassa, em 2015, a

média do custo de cavacos de eucalipto no Brasil estava em R\$ 77,00 t<sup>-1</sup>, enquanto que o bagaço de cana era vendido por R\$ 150,00 t<sup>-1</sup> (Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, 2015; Cana Online, 2015). Na verdade, o mercado pode variar de acordo com a época do ano, mas os preços do bagaço de cana foram sempre mais caros provavelmente devido ao aumento de demanda para aplicações em bioenergia, como no caso da cogeração. Portanto, os dois tipos de biomassa mostram bom potencial para produção de etanol celulósico, sendo que os cavacos de *E. urograndis* resultariam em 22,7 % a mais de etanol t<sup>-1</sup> do que o bagaço.

**Tabela 17.** Projeção da produção de etanol celulósico por tonelada de biomassa processada.

| <b>ETAPAS</b>                                    | <b>Bagaço de cana-de-açúcar *</b>          | <b>Cavacos de <i>E. urograndis</i></b>     |
|--|--|--|
| <b>Explosão a vapor <sup>1</sup></b>             | 64,0 % rendimento<br>fração insolúvel      | 61,4 % rendimento<br>fração insolúvel      |
| <b>Hidrólise enzimática <sup>2</sup></b>         | 102 g L <sup>-1</sup> Glc                  | 124 g L <sup>-1</sup> Glc                  |
| Total de glucose liberada                        | 515 g kg <sup>-1</sup> Glc                 | 625 g kg <sup>-1</sup> Glc                 |
| <b>Eficiência da fermentação<sup>3</sup></b>     | 87,1 %                                     | 88,1 %                                     |
| Produção de etanol por ton                       | 178,0 L t <sup>-1</sup>                    | 218,5 L t <sup>-1</sup>                    |
| Produção teórica de etanol por ton               | 204,4 L t <sup>-1</sup>                    | 248,0 L t <sup>-1</sup>                    |
| <b>Produtividade da biomassa <sup>4</sup></b>    | 20,16 t ha <sup>-1</sup> ano <sup>-1</sup> | 25,92 t ha <sup>-1</sup> ano <sup>-1</sup> |
| Produtividade a partir da 1 <sup>a</sup> geração | 5760 L ha <sup>-1</sup> ano <sup>-1</sup>  | -  |
| Produtividade a partir da 2 <sup>a</sup> geração | 1794 L ha <sup>-1</sup> ano <sup>-1</sup>  | 2832 L ha <sup>-1</sup> ano <sup>-1</sup>  |
| Produtividade total de etanol                    | 7554 L ha <sup>-1</sup> ano <sup>-1</sup>  | 2832 L ha <sup>-1</sup> ano <sup>-1</sup>  |

<sup>1</sup> Bagaço de cana-de-açúcar e eucalipto foram pre-tratados por 195 °C durante 7,5 min e 210 °C durante 5 min, respectivamente;

<sup>2</sup> Hidrólise dos substratos pré-tratados a vapor em Labfors 5HT usando 20 % de ST e 62,5 mg de Cellic CTec3 g<sup>-1</sup> ST a 50 °C por 72 h (2,5 L volume total);

<sup>3</sup> 1 g L<sup>-1</sup> de *S. cerevisiae* Thermosacc Dry a 37 °C por 12 h

<sup>4</sup> Dados disponíveis em Comércio Ambiental (2014) e Carvalho et al. (2015) para *E. urograndis* chips e bagaço de cana, respectivamente.

## 5 CONCLUSÃO

O pré-tratamento por explosão a vapor de cavacos de *E. urograndis* foi otimizado dentro das condições empregadas utilizando auto-hidrólise. O aumento da severidade apresentou relação direta com os rendimentos da fração insolúvel e com os equivalentes de glucose obtidos por hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados. Por outro lado, o grau de polimerização da celulose também apresentou relação direta com a severidade, entretanto neste caso, maiores severidades na explosão a vapor geraram substratos com menor grau de polimerização.

A metanólise ácida das frações solúveis indicaram a presença de 4-O-metil-glucurônico, arabinose, ramnose e ácido galacturônico quando empregadas condições mais brandas de pré-tratamentos, indicando que houve hidrólise e solubilização das pectinas do material para a fração solúvel. Os teores de glucose encontrados nesta fração provavelmente não são decorrentes de celulose e sim de hemiceluloses que a contêm, como xiloglucanas e galactoglucomananas. Já a metanólise das frações insolúveis demonstrou que galactoglucomananas foram mais resistentes ao pré-tratamento do que arabinoglucuronoxilanas, e que parte das ramnogalacturonanas (pectinas) resistiram a essas condições.

Os dados de hidrólise enzimática em 96 h foram validados para as enzimas Cellic CTec2 e CTec2, e para ambos os casos a temperatura apresentou efeito estatístico significativo. A melhor condição experimental foi definida pelo experimento EAH6 (210 °C, 5 min) e com o emprego de Cellic CTec3 na hidrólise enzimática, usando como critério o rendimento final de glucose foi obtido após pré-tratamento e hidrólise. Os ensaios de fermentação com diferentes leveduras foram realizados empregando hidrolisados de eucalipto e bagaço de cana, de modo a permitir um estudo comparativo entre essas matrizes. Ambos alcançaram valores acima de 19 g L<sup>-1</sup> e eficiências superiores a 75 % tanto para Thermosacc Dry quanto para CAT-1.

O efeito da designificação alcalina foi avaliado na melhor condição de explosão a vapor empregando 0,1 e 0,5 g de NaOH g<sup>-1</sup> de substrato seco, sendo que as extrações foram assistidas ou não por ultrassom. Devido ao baixo valor de designificação ao se empregar a menor concentração de hidróxido de sódio e na falta de diferença estatisticamente significativa ao empregar o ultrassom, optou-se por

avaliar a deslignificação dos outros pontos do planejamento fatorial da explosão a vapor empregando 0,5 g de NaOH g<sup>-1</sup> de substrato seco.

As hidrólises enzimáticas de eucalipto e bagaço de cana explodidos a vapor, quando realizadas em alto teor de sólidos totais, geraram 124 e 102 g L<sup>-1</sup> de glucose após 72 h de reação, respectivamente. As fermentações destes hidrolisados com Thermosacc Dry a uma concentração inicial de 60 g L<sup>-1</sup> de glucose alcançaram 27,3 e 25 g L<sup>-1</sup> de etanol para os substratos derivados de eucalipto e bagaço de cana, respectivamente. Ao comparar os resultados de pré-tratamento, hidrólise e fermentação, conclui-se que os cavacos de eucalipto apresentaram maior potencial para produção de etanol celulósico dentro das condições testadas neste estudo, alcançando 40 L de etanol t<sup>-1</sup> a mais do que o bagaço de cana. No entanto, essa comparação limitou-se à fermentação de hexoses por *S. cerevisiae*.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHYUTHAN, K. E.; ACHYUTHAN, A. M.; ADAMS, P. D.; DIRK, S. M.; HARPER, J. C.; SIMMONS, B. A.; SINGH A. K. Supra molecular self-assembled chaos: polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8641-8688, 2010.
- ALMEIDA, A. C.; SOARES, J. V. Comparação entre uso de água em plantações de *Eucalyptus grandis* e floresta ombrófila densa (Mata Atlântica) na costa leste do Brasil. **Revista Árvore**, v. 27, n. 2, p. 159-170, 2003.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- ARANTES, V.; GOURLAY, K.; SADDLER, J. N. The enzymatic hydrolysis of pretreated pulp fibers predominantly involves "peeling/erosion" modes of action. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 87, 2014.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 4, 2010.
- ATTALA, R. H. The structure of native cellulose. In: SUOMINEN, P. AND REINIKAINEN, T. (Eds.) **Proceedings of Tricel Symposium on *Trichoderma reesei* Cellulases and others hydrolases**. Helsinki, Finland: Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, cap. 8, p. 281-290, 1993.
- AZEVEDO, P. H. S. M.; GARCIA, A.; DUARTE, J. M. P.; RISSATO, G. M.; CARRARA, V. K. P.; MARSON, R. A. Limiar anaeróbio e bioenergética: uma abordagem didática. **Revista da Educação Física**, v. 20, n. 3, p. 453-464, 2009.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.
- BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; CRUZ, M. P. Composição química de extrativos lipofílicos e polares de madeira de *Eucalyptus grandis*, **Ciência e Engenharia**, v. 15, p. 13-20, 2005.
- BASTOS, V. D. Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias. BNDES Setorial. Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, 2007.

- BAUDEL, H. M. Pré-tratamento e hidrólise. III Workshop Tecnológico sobre: Hidrólise para produção de etanol, 2006.
- BECKHAM, G. T.; BOMBLE, Y.; MATTHEWS, J. F.; TAYLOR, C. B.; RESCH, M. G.; YARBROUGH, J. M.; DECKER, S. R.; BU, L.; ZHAO, X. C.; MCCABE, C.; WHOLERT, J.; BERGENSTRÄHLE-WOHLERT, M.; BRADY, J. W.; ADNEY, W. S.; HIMMEL, M. E. The O-glycosylated linker from the *Trichoderma reesei* family 7 cellulase is a flexible, disordered protein. **Biophysical Journal**, v. 99, n. 11, p. 3773–3781, 2010.
- BENSAH, E. C.; KEMANUSUOR, F.; MIEZAH, K.; KÁDÁR, Z.; MENSAH, M. African perspective on cellulosic ethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 1-11, 2015.
- BHARDWAJ, V.; DEGRASSI, G.; BHARDWAJ, R. K. Bioconversion of cellulosic materials by the action of microbial cellulases, **International Research Journal of Engineering and Technology**, v. 4, n. 8, 2017.
- BOZELL, J. J.; PETERSEN, G. R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates – the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. **Green Chemistry**, v. 12, p. 539-554, 2010.
- BRAGATTO, J. Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* spp. para a produção de bioetanol, Tese de Doutorado em Ciências, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- BRANCO, R., F.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S.; A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: Xylitol enzymatic production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 3241-3246, 2011.
- BRAUNBECK, O. A.; VOLPATO, C. E. S.; OLIVEIRA C. A. A. A colheita mecanizada e enfardamento de capim elefante, Encontro de Energia no Meio Rural, 2003.
- CAIRNS, J.R.K.; ESEN, A.  $\beta$ -Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 3389-3405, 2010.
- CANA ONLINE. <http://www.canaonline.com.br/conteudo/comercio-de-bagaco-de-cana-virou-bom-negocio-para-as-usinas.html#.VsNt8rQrKt9> (2015). Acesso em: 13 outubro 2016.
- CARA, C.; RUIZ, E.; BALLESTEROS, M.; MANZANARES, P.; NEGRO, M. J.; CASTRO, E. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. **Fuel**, v. 87, p. 692-700, 2008.

- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754-4766, 2010.
- CARRASCO, C.; BAUDEL, H. M.; SENDELIUS, J.; MODIG, T.; ROSLANDER, C.; GALBE, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; ZACCHI, G.; LIDÉN, G. SO<sub>2</sub>-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 64-73, 2010.
- CARVALHO, D. M.; SEVASTYANOVA, O.; PENNA, L. S.; SILVA, B. P.; LINDSTRÖM, M. E.; COLODETTE, J. L. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 118-126, 2015.
- CASTRO, E.; NIEVES, I. U.; MULLINNIX, M. T.; SAGUES, W. J.; HOFFMAN, R. W.; FERNÁNDEZ-SANDOVAL, M. T.; TIAN, Z.; ROCKWOOD, D. L.; TAMANG, B.; INGRAM, L.O. Optimization of dilute-phosphoric-acid steam pretreatment of *Eucalyptus benthamii* for biofuel production. **Applied Energy**, v. 125, p. 76-83, 2014.
- CHANDRA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W. E.; BERLIN, A.; PAN, X.; SADDLER, J. N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 108, p. 67-93, 2007.
- CHEN, Y.; STEVENS, M. A.; ZHU, Y.; HOLMES, J.; XU, H. Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification, **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 8, 2013.
- CHIARAMONTI, D.; PRUSSI, M.; FERRERO, S.; ORIANI, L.; OTTONELLO, P.; TORRE, P.; CHERCHI, F. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 25-35, 2012.
- CIB, Conselho de Informações sobre Biotecnologia. Guia do eucalipto: oportunidades para um desenvolvimento sustentável. 2008. Disponível em: <[http://www.cib.org.br/pdf/Guia\\_do\\_Eucalipto\\_junho\\_2008.pdf](http://www.cib.org.br/pdf/Guia_do_Eucalipto_junho_2008.pdf)>
- CONAB, Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar, v. 3 - Safra 2016/17, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-77, 2017a.
- CONAB, Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar, v. 4 - Safra 2017/18, n. 2 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-73, 2017b.

- COUGHLAN, M.P., HAZLEWOOD, G.P.  $\beta$ -1,4-D-xylan degrading enzyme systems – biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 17, p. 259-289, 1993.
- CURRELI, N.; FADDA, M. B.; RESCIGNO, A.; RINALDI, C. A.; SODDU, G.; SOLLAI, F.; VACCARGIU, S. SANJUST, E.; RINALDI, A. Mild alkaline/oxidative pretreatment of wheat straw. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 665-670, 1997.
- DEVARAPALLI, M.; ATIYEH, H. K. A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation. **Biofuel Research Journal**, v. 7, p. 268-280, 2015.
- DOUGHERTY, D.; WRIGHT, J. Silviculture and economic evaluation of eucalypt plantations in the Southern USA. **BioResources**, v. 7, n. 2, p. 1994-2001, 2012.
- DUQUE, A.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M. Steam explosion as lignocellulosic biomass pretreatment. In: MUSSATO, S. I. (Ed.) **Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery**. Amsterdam: Elsevier, cap. 15, p. 349-368, 2016.
- EMMEL, A.; MATHIAS, A. L.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid-catalysed steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 105-115, 2003.
- ERAN, M. S. E MA, K. Decarboxylation of pyruvate to acetaldehyde for ethanol production by hyperthermophiles, **Biomolecules**, v. 3, p. 578-596, 2013.
- FANG, H.; XIA L. Cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* and its application in enzymatic hydrolysis of agricultural residues. **Fuel**, v. 143, p. 211-216, 2015.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- FOREMAN, P. K.; BROWN, D.; DANKMEYER. L.; DEAN, R.; DIENER, S.; DUNN-COLEMAN, N. S.; GOEDEGEBUUR, F.; HOUFEK, T.; ENGLAND, G.; KELLEY, A.; MEERMAN, H.; MITCHELL, T.; MITCHINSON, C.; OLIVARES, H.; TEUNISSEN, P.; YAO, J.; WARD, M. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 34, p. 31988-31997, 2013.
- GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Study of the sugar cane bagasse hydrolysis by using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 78-88, 2006.

- GAO, D.; CHUNDAWAT, S. P. S.; KRISHNAN, C.; BALAN, V.; DALE, B. Mixture optimization of six core glycosyl hydrolases for maximizing saccharification of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2770-2781, 2010.
- GEDDES, C. C.; PETERSON, J. J.; ZACCHI, G.; MULTINNIX, M. T.; SHANMUGAN, K. T.; INGRAM, L. O. Optimization the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1851-1857, 2010.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.
- GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, B.; Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.
- GOMES, G. R. Produção de 5-(hidroximetil)-furfural a partir de cana-de-açúcar, Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal do Paraná, 2016.
- GONZALEZ, R.; TREASURE, T.; PHILLIPS, R.; JAMEEL, H.; SALONI, D.; ABT, R.; JAMEEL, H.; SALONI, D.; WRIGHT, J. Converting Eucalyptus biomass into ethanol: Financial and sensitivity analysis in a co-current dilute acid process. Part II. **Biomass Bioenergy**, v. 35, p. 767-772, 2011.
- HATAKEYAMA, H. E HATAKEYAMA, T. Lignin Structure, Properties, and Applications. **Advances in Polymer Science**, n. 232, p. 1-63, 2010.
- HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10-18, 2009.
- HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. H. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5-45, p. 2-12, 2012.
- HOYER, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Influence of fiber degradation and concentration of fermentable sugars on simultaneous saccharification and fermentation of high-solids spruce slurry to ethanol. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, p. 145, 2013.
- HSU, T. C.; GUO, G. L.; CHEN, W. H.; HWANG, W. S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4907-4913, 2009.
- HYMAN, D.; SLUITER, A.; CROCHER, D.; JOHNSON, D.; SLUITER, J.; BLACK, S.; SCARLATA, C. Determination of acid soluble lignin concentration curve by

- UV-Vis spectroscopy - Technical Report: NREL/TP-510-42617, **National Renewable Energy Laboratory**, 2008.
- INGRAM, L. O.; WOOD, B. E.; ALDRICH, H. C. Ultrasound stimulates ethanol production during the simultaneous saccharification and fermentation of mixed waste office paper. **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 232-237, 1997.
- ISHOLA, M. M.; ISROI; TAHERZADEH, M. J. Effect of fungal and phosphoric acid pretreatment on ethanol production from oil palm empty fruit bunches (OPEFB). **Bioresource Technology**, v. 165, p. 9-12, 2014.
- KIM, K. H.; HONG, J. Supercritical CO<sub>2</sub> pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 139-144, 2001.
- KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 36, p. 36, 2005.
- KLOCK, U.; MUÑIZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S. Química da Madeira, Fupef, 3ª edição, 2006.
- KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.
- LEAL, M. R. L. V.; NOGUEIRA, L. A. H. The sustainability of sugarcane ethanol: the impacts of the production model. **Chemical Engineering Transactions**, v. 37, p. 835-840, 2014.
- LEVASSEUR, A.; DRULA, E.; LOMBARD, V.; COUTINHO, P. M. HENRISSAT, B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 14, 2013.
- LI, B.; BALAN, V.; YUAN, Y.; DALE, B. E. Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1285-1292, 2010.
- LIMA, M. A.; LAVORENTE, G. B.; SILVA, H. K. P.; BRAGATTO, J.; REZENDE, C. A.; BERNARDINELLI, O. D.; AZEVEDO, E. R.; GOMEZ, L. D.; MCQUEEN-MASON, S. J.; LABATE, C. A.; POLIKARPOV, I.; Effects of pretreatment on morphology, chemical composition and enzymatic digestibility of eucalyptus bark: a potentially

- valuable source of fermentable sugars for biofuel production - part 1. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, 2013.
- LIN, Y. E TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 627-642, 2006.
- LIN, Y-S.; LEE, W-C.; DUAN, K-J.; LIN, Y-H.; Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation in rotary drum reactor using thermotolerant *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Energy**, v. 105, p. 389-394, 2013.
- LIU, Z-H.; QIN, L.; ZHU, J-Q.; LI, B-Z.; YUAN, Y-J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. **Biotechnology for Biofuels**. v. 7, n. 167, 2014.
- MA, F.; YANG, NA.; XU, C.; YU, H.; WU, J.; ZHANG, X. Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9600-9604, 2010.
- MARTINS, L. H. S.; RABELO, S. S.; COSTA, A. C. Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse **Bioresource Technology**, v. 191, p. 312-321, 2015.
- MARTÍN-SAMPEDRO, R.; EUGENIO, M. E.; GARCÍA, J. C.; LOPEZ, F.; VILLAR, J.C; DIAZ, M. J. Steam explosion and enzymatic pre-treatments as an approach to improve the enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus globulus*. **Biomass and Bioenergy**, v. 42, p. 97-106, 2012.
- MARTIN-SAMPEDRO, R.; REVILLA, E.; VILLAR, J. C.; EUGENIO, M. E. Enhancement of enzymatic saccharification of *Eucalyptus globulus*: steam explosion versus steam treatment **Bioresource Technology**, v. 167 p. 186-191, 2014.
- MAZAREI, M.; AL-AHMAD, H.; RUDIS, M. R.; JOYCE, B. L.; STEWART JR, C. N. Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cell suspension cultures: establishment, characterization, and application. **Plant Science**, v. 181, p. 712-715, 2011.
- MCINTOSH, S.; VANCOV, T.; PALMER, J.; SPAIN, M. Ethanol production from *Eucalyptus* plantation thinnings. **Bioresource Technology**, v. 110, p.264-272, 2012.
- MELO, E. B. E CARVALHO, I.  $\alpha$  e  $\beta$ -glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos, **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 840-843, 2006.



- MENON, V. e RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522-550, 2012.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, Resenha Energética Brasileira – Exercício de 2016, Edição junho de 2017.
- MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526-544, 2013.
- MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.
- MORAES, A., O.; MODESTO, L. F.; RAMIREZ, N. I. B.; PEREIRA JR, N. Reuse of residual biomass of cellulose industry for second generation bioethanol production. **Journal of Advances in Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 768-772, 2016.
- MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* Parte I – Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. Sociedade de Investigações Florestais. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.
- NELSON, D. L. E COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehniger, Artmed Editora, Edição 6, 2014.
- NEVES, P. V. Caracterização do extrato etanólico do bagaço de cana-de-açúcar e determinação da sua influência sobre o processo de produção de etanol celulósico. Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal do Paraná, 2014.
- NEVES, P. V.; PITARELO, A. P.; RAMOS, L. P. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: Effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. **Bioresource Technology**, v. 208, p. 184-194, 2016.
- NOVOZYMES. Cellulosic Ethanol - Novozymes Cellic CTec 3. Application Sheet, p. 1-5, 2012. Disponível em: < [http://www.bioenergy.novozymes.com/en/cellulosic-ethanol/Cellic-HTec3/Documents/CE\\_APP\\_Cellic\\_Ctec3.pdf](http://www.bioenergy.novozymes.com/en/cellulosic-ethanol/Cellic-HTec3/Documents/CE_APP_Cellic_Ctec3.pdf)>.

- NUNES, A. P.; POURQUIE, J. Steam explosion pretreatment and enzymatic hydrolysis of eucalyptus wood. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 107-110, 1996.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S.; Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v.33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.
- OLIVEIRA, I. S.; CHANDEL, A. K.; SILVA, M. B.; SILVA, S. S. Environmental assessment of residues generated after consecutive acid-base pretreatment of sugarcane bagasse by advanced oxidative process. **Sustainable Chemical Processes**, v.1, n. 20, 2013.
- OLIVEIRA, L. R. M.; NASCIMENTO, V. M.; GONÇALVES, A. R.; ROCHA, G. J. M. Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 1-7, 2014.
- OVEREND, R. P.; CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**. v. 321, n. 1561, p. 523-536, 1987.
- PAN, D. T.; TAN, C.; Innovative pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical CO<sub>2</sub> followed by alkaline hydrogen peroxide. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 192-197, 2014.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.
- PAPPAS, I. A.; KOUKOURA, Z.; TANANAKI, C.; GOULAS, C.; Effect of dilute acid pretreatment severity on the bioconversion efficiency of *Phalaris aquatic* L. lignocellulosic biomass into fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 395-402, 2011.
- PARK, Y.C.; KIM, J. S.; Comparison of various alkaline pretreatment methods of lignocellulosic biomass. **Energy**, v. 47, p. 31-35, 2012.
- PENG, W.; WU, Y.; QI, H.; PENG, Y.; WU, S. Analysis on Bioenergy Resource of *Eucalyptus urograndis* Wood. **Power and Energy Engineering Conference, APPEEC 2009. Asia-Pacific**, 1-3, 2009.
- PEREIRA, H.; GRACA, J.; RODRIGUES, J. C. Wood chemistry in relation to quality. In: BARNETT, J.R., JERONIMIDIS, G. (Eds.), **Wood Quality and Its Biological Basis**, CRC Press Oxford, cap. 3, p. 53-86, 2003.
- PÉREZ, J. A.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M.; SÁEZ, F.; NEGRO, M. J.;

- MANZANARES, P. Optimizing liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. **Fuel**, v. 87, p. 3640-3647, 2008.
- PICART, P.; DE MARÍA, P.; SCHALLMEY, A. From gene to biorefinery: microbial  $\beta$ -etherases as promising biocatalysts for lignin valorization, **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 916, 2015.
- PINTO, P. C.; EVTUGUIN, D. V.; PASCOAL NETO, C. Structure of HWD glucuronoxylans: modific. and impact on pulp retention during wood kraft pulping. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 489-497, 2005.
- PITARELO A. P., ZANDONA FILHO, A.; SZCZERBOWSKI D.; RAMOS, L. P. NDIAVE, P. M. Dossiê de Pesquisa: Fontes Renováveis de Energia. 1. ed. Curitiba: Copel, v. 1, p. 256, 2012b.
- PITARELO, A. P.; DA SILVA, T. A.; PERALTA-ZAMOURA, P. G.; RAMOS, L. P.; Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, vol. 35, no. 8, p. 1509-1509, 2012.
- PITARELO, A. P.; FONSECA, S. F.; CHIARELLO, L. M.; GÍRIO, F. M.; RAMOS, L. P. Ethanol production from sugarcane bagasse using phosphoric acid-catalyzed steam explosion. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 10, p. 1889-1898, 2016.
- POPA, V. I.; SPIRIDON, I. Hemicellulose: Structure and Properties. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. Cap 18, p. 475-489, 2005.
- QI, L.; LI, W-C.; ZHU, J-Q.; LI, B-Z.; YUAN, Y-J. Hydrolysis of lignocellulosic biomass to sugars. In: FANG, Z. SMITH JR, R. L.; QI, X. (Eds.) **Production of Platform Chemicals from Sustainable Resources**, Springer Singapore, cap. 1, p. 3-41 2017.
- QIN, W. High consistency enzymatic hydrolysis of lignocellulosic. Faculty of Forestry. The University of British Columbia, 2010.
- RABELO, S. C.; ANDRADE, R. R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA. A. C.; Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, v. 136, p. 340-357, 2014.
- RABINOVICH, M. L.; MELNICK, M. S.; BOLOBOVA, A. V. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. **Biochemistry-Moscow**, v. 67, n. 8, p. 850-871, 2002.

- RAMBURAN, S. Interactions affecting the optimal harvest age of sugarcane in rainfed regions of South Africa. **Field Crops Research**, v. 183, p. 276-281, 2015.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.
- RAMOS, L. P.; SILVA, L.; BALLEM, A. C.; PITARELO, A. P.; CHIARELLO, L. M.; SILVEIRA M. H. L. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 195-202, 2015.
- RAMOS, L. P.; SILVEIRA, M. H. L.; CHIARELLO, L. M.; GOMES, G. R.; CORDEIRO, C. S.. Perspectivas à implementação de projetos de biorrefinaria baseadas no uso de materiais lignocelulósicos. In: AREA, M. C.; PARK, S. W. (Org.). *Panorama de la industria de celulosa y papel y materiales lignocelulósicos* 2016. 1ed. Posadas: Universidad Nacional de Misiones, cap. 6, p. 84-119, 2017.
- RANA, V.; ECKARD, A. D.; AHRING, B. K. Comparison of SHF and SSF of wet exploded corn stover and loblolly pine using in-house enzymes produced from *T. reesei* RUT C30 and *A. saccharolyticus*. **Springerplus**, v. 3, n. 516, 2014.
- REZENDE, C. A.; LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E. R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 54, 2011.
- RFA, Renewable Fuels Association, World fuel ethanol production. **2016**. Disponível em < <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454099103927-61e598f7-7643>>
- RIBEIRO, M. A.; OIKAWA, H.; MORI, M. N.; NAPOLITANO, C. M.; DUARTE, C. I. Degradation mechanism of polysaccharides on irradiated sugarcane bagasse. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 84, p. 115-118, 2013.
- ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SILVA, V. F. N.; GOMES, E. O.; GONÇALVES, A. R. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 447-452, 2012.
- RÖHRLING, A.; POTTHAST, A.; ROSENAU, T.; LANGE, T.; BORGARDS, A.; SIXTA, H.; KOSMA, P. A novel method for the determination of carbonyl groups in cellulose by fluorescence labeling. 2. Validation and applications. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 969-975, 2002b.

- RÖHRLING, A.; POTTHAST, A.; ROSENAU, T.; LANGE, T.; EBNER, G.; SIXTA, H.; KOSMA, P. A novel method for the determination of carbonyl groups in cellulose by fluorescence labeling. 1. Method development. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 959-968, 2002a
- ROMANÍ, A.; GARROTE, G.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M. Second generation bioethanol from steam exploded *Eucalyptus globulus* wood. **Fuel**, v. 111, p. 66-74, 2013.
- ROMANÍ, A.; RUIZ, H. A.; PEREIRA, F. B.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Integrated approach for effective bioethanol production using whole slurry from autohydrolyzed *Eucalyptus globulus* wood at high-solid loadings. **Fuel**, v. 135, p. 482-491, 2014.
- SANDGREN, M.; SAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 89, p. 246-291, 2005.
- SANTOS, H. F. Análise conformacional de modelos de lignina, **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 480-490, 2001.
- SANTOS, I. D.; Influência dos teores de lignina, holocelulose e extrativos na densidade básica e contração da madeira e nos rendimentos e densidade do carvão vegetal de cinco espécies lenhosas do cerrado. Dissertação de Mestrado em Engenharia Florestal. Universidade de Brasília, 2008.
- SANTOS, J. R.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R.; MARTÍN, C. Comparação entre processos em SHF e SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, p. 904-908, 2010.
- SANYER, N.; CHIDESTER, G. H.; Manufacture of wood pulp. In: BROWING, B. L. (Ed.) **The chemistry of wood**. New York, Interscience Publishers, cap. 10, p. 441-534, 1963.
- SCHÜTT, F.; WESTERENG, B.; HORN, S. J.; PULS, J.; SAAKE, B. Steam refining as an alternative to steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 476-481, 2012.
- SCHWALD, W.; CHAN, M.; SADDLER, J. N. Comparison of HPLC and colorimetric methods for measuring cellulolytic activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 398-403, 1988.

- Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná.  
<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/florestais/Flor2015abr.xls>  
 (2015). Acesso em: 21 Fevereiro 2017.
- SILVA, G. M. Avaliação de diferentes configurações de hidrólise enzimática e fermentação utilizando bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol 2G, Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2015.
- SILVA, G. T.; CHIARELLO, L. M.; LIMA, E. M.; RAMOS, L. P. Sono-assisted alkaline pretreatment of sugarcane bagasse for cellulosic ethanol production. **Catalysis Today**, v. 269, p. 21–28, 2015.
- SILVEIRA, M. H. L.; SIIKA-AHO, M.; KRUNS, K.; GARRIGA, L. M.; RAMOS, L. P. The Essential Role of Plant Cell Wall Degrading Enzymes in the Success of Biorefineries: Current Status and Future Challenges. In: S. S. DA SILVA AND A. K. CHANDEL (Eds.), **Biofuels in Brazil**, Springer, Cham, cap. 8, p. 151-172, 2014.
- SILVEIRA, M. H.; MORAIS, A. R.; DA COSTA LOPES, A. M.; OLEKSZYSZEN, D. N.; BOGEL-ŁUKASIK, R.; ANDREAUS, J.; PEREIRA RAMOS, L. Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries, **ChemSusChem**, v. 8, p. 3366-3390, 2015a.
- SILVEIRA, M.; VANELLI, B. A.; CORAZZA, M. L.; RAMOS, L. P. Supercritical carbon dioxide combined with 1-butyl-3-methylimidazolium acetate and ethanol for the pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 389-396, 2015b.
- SINGH, J.; SUHAG, M.; DHAKA, A.; Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. **Carbohydrate Polymers**, v.117, p.624 - 631, 2015.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; WOLFE, J. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples - Technical Report: NREL/TP-510-42621, **National Renewable Energy Laboratory**, 2008b.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C. SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Ash in Biomass - Technical Report NREL/TP-510-42622. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008c.

- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass - Technical Report NREL/TP-510-42618, **National Renewable Energy Laboratory**, 2012.
- SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass - Technical Report: NREL/TP-510-42619, **National Renewable Energy Laboratory**, 2008a.
- SOUZA, C. J. A.; COSTA, D. A.; RODRIGUES, M. Q. R. B.; SANTOS, A. F.; LOPES, M. R.; ABRANTES, A. B. P.; COSA, P. S.; SILVEIRA, W. B.; PASSO, F. M. L.; FIETTO, L. G.; The influence of pre-saccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 63-69, 2012.
- SUN, R.; WANG, K.; JIANG, J.; XU, F. Influence steaming explosion time on the physical-chemical properties of cellulose from Lespedeza stalks (*lespedera crytobotrya*). **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5288-5294, 2009.
- SUN, S.-N.; LI, M.-F.; YUAN, T.-Q.; XU, F.; SUN, R.-C. Effect of ionic liquid/organic solvent pretreatment on the enzymatic hydrolysis of corncob for bioethanol production. Part 1: Structural characterization of the lignins. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 570-577, 2013.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.
- SUNDBERG, A.; SUNDBERG, K.; LILLANDT, C.; HOLMHOM, B. Determination of hemicelluloses and pectins in wood and pulp fibres by acid methanolysis and gas chromatography. **Nordic Pulp and Paper Research Journal**, v. 11, p. 216-219, 1996.
- TERÁN HILARES, R.; SWERTS, M. P.; AHMED, M. A.; RAMOS, L.; SILVA, S. S.; SANTOS, J. C. Organosolv pretreatment of sugar cane bagasse for bioethanol production, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 14, p. 3833–3838, 2017.
- TORRE, M. J.; MORAL, A.; HERNÁNDEZ, M. D.; CABEZA, E.; TIJERO, A.; Organosolv lignin for biofuel. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 58-63, 2013.
- TREEBUPACHATSAKUL, T.; SHIOYA, K.; NAKAZAWA, H.; KAWAGUCHI, T.; MORIKAWA, Y.; SHIDA, Y. Utilization of recombinant *Trichoderma reesei*



- expressing *Aspergillus aculeatus*  $\beta$ -glucosidase I (JN11) for a more economical production of ethanol from lignocellulosic biomass. **Journal of Bioscience and Biotechnology**, v. 120, p. 657-665, 2015.
- VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1458-1480, 2012.
- VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VILKARI, L.; Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited: reduced amount of water counterbalances the need for CBMs, **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 30, 2013.
- VELOSO, D. P.; NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L. Isolamento e análise estrutural de ligninas, **Química Nova**, v. 16, n. 5, p. 435-448, 1993.
- VIANA, R. B.; RIOS, E. C. S.A V.; OLIVEIRA, P. G. A monocultura do eucalipto feita por empresas e grupos sociais no norte do estado do Espírito Santo, **Conhecimento em Destaque**, v. 5, n. 12, 2016.
- VINZANT, T. B.; HIMMEL, M. E.; ADNEY, W. S.; DECKER, S. R.; BAKER, J. O.; KINTER, M. T.; SHERMAN, N. E.; FOX, J. W. Fingerprint *Thichoderma reesei* hydrolases in a commercial cellulase preparation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 99-109, 2001.
- WALTON, P. H. E DAVIES, G. J. On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monooxygenases, **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 31 p. 195–207, 2016.
- WANG, K.; JINGHUAN, C.; SUN, S. N., SUN, R-C. Steam explosion. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; BINOD, P.; LARROCHE, C. **Pretreatment of Biomass: processes and technologies**. Elsevier: Amsterdam, cap. 6 , p. 75-104, 2015.
- WANG, Q.; MA, H.; XU, W.; GONG, L.; ZHANG, W.; ZOU, D. Ethanol production from kitchen garbage using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 604-610, 2008.
- WATANABE, I.; NAKAMURA, T.; SHIMA, J. Strategy for simultaneous saccharification and fermentation using a respiratory-deficient mutant of *Candida glabrata* for bioethanol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, p. 176-179, 2010.
- WEERACHANCHAI, P.; LEE, J.; Recyclability of an ionic liquid for biomass pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 160, p. 336-343, 2014.

- WERTZ, J.; BÉDUÉ, O.; MERCIER, J. P. **Cellulose Science and Technology**. Lausanne: EPFL Press, p. 350, 2010.
- WILDSCHUT, J.; SMIT, A. T.; REITH, J. H.; HUIJGEN, W. J. J.; Ethanol-based organosolv fractionation of wheat straw for the production of lignin and enzymatically digestible cellulose. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 58-66, 2013.
- WINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnology Progress**. v. 19, p. 1109-1117, 2003.
- WOOD, T. M.; MCGRAE, S. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. In: BROWN, R. D and JURASEK, L. (Eds.) **Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis**, cap. 10, p 181-209, 1979.
- WROBEL-TOBISZEWSKA, A.; BOERSMA, M.; SARGISON, J.; ADAMS, P.; JARICK, S. An economic analysis of biochar production using residues from Eucalypt plantations. **Biomass Bioenergy**, v. 81, p. 177-182, 2015.
- WU, J.; LIU, Z.; HUANG, G.; CHEN, D.; ZHANG, W.; SHAO, Y.; WAN, S.; FU, S. Response of soil respiration and ecosystem carbon budget to vegetation removal in Eucalyptus plantations with contrasting ages, **Scientific Reports**, v. 4, p. 6262, 2014.
- YUAN, D.; RAO, K.; RELUE, P.; VARANASI, S. Fermentation of biomass sugars to ethanol using native industrial yeast strains. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3246-3253, 2011.
- ZHANG, C.; LU, J.; ZHANG, X.; MACARTHUR, K.; HEGGEN, M.; LI, H.; WANG, F. Cleavage of the lignin  $\beta$ -O-4 ether bond via a dehydroxylation–hydrogenation strategy over a NiMo sulfide catalyst, **Green Chemistry**, v. 18, p. 6545- 6555, 2016.
- ZHANG, X.; QIN, W.; PAICE, M. G.; SADDLER, J. N. High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5890-5897, 2009.
- ZHAO, X.; ZHOU, Y.; LIU, D.; Kinetic model for glycan hydrolysis and formation of monosaccharides during dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.105, p.160-168, 2012.

- ZHENG, M.; LI, L.; LI, X.; YANG, X.; HE, Y. Enhancing anaerobic biogasification of corn stover through wet state NaOH pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5140-5145, 2009.
- ZHENG, Y.; ZHAO, J.; XU, F.; LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, p. 35-53, 2014.
- ZHOU, S. WEIMER, P. J.; HATFIELD, R. D.; RUNG, T. M.; DIGMAN, M. Improving ethanol production from alfalfa stems via ambient-temperature acid pretreatment and washing. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 286-292, 2014.
- ZHUANG, X.; WANG, W.; YU, Q.; QI, W.; WANG, Q.; TAN, X.; ZHOU.; YUAN, Z. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products, **Bioresource Technology**, v. 199, p. 68-75, 2016.